

**BRUNO BLANCO ARAUJO**

**EFEITOS INGESTIVOS E COMPORTAMENTAIS DE  
MICROINJEÇÕES DE METERGOLINA OU 8-OH-DPAT NO  
NÚCLEO ARQUEADO DO HIPOTÁLAMO E NO HIPOTÁLAMO  
LATERAL DE RATOS**

**FLORIANÓPOLIS, 2006**

**BRUNO BLANCO ARAUJO**

**EFEITOS INGESTIVOS E COMPORTAMENTAIS DE  
MICROINJEÇÕES DE METERGOLINA OU 8-OH-DPAT NO  
NÚCLEO ARQUEADO DO HIPOTÁLAMO E NO HIPOTÁLAMO  
LATERAL DE RATOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para obtenção do grau de Mestre em  
Neurociências e Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. José Marino Neto

**FLORIANÓPOLIS, 2006**

*Gostaria de agradecer:*

*Ao Professor Marino, pela competência e dedicação durante a realização desse trabalho e pelos constantes ensinamentos que me fizeram crescer.*

*A todos os professores e funcionários do curso de neurociências, que de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização desse trabalho.*

*Ao Nivaldo, secretário do curso de pós-graduação em Neurociências e Comportamento, UFSC, pelo auxílio e atenção.*

*Às amigas e colaboradoras, Caroline Fabrin, Maike Heerdt e Vivian W. de Aquino, pela dedicação e pelo empenho dados a este trabalho.*

*Aos colegas da fisiologia, em especial, aos amigos Eduardo S. da Silva, Fábio Borges e Murilo M. dos Santos, pelas constantes trocas de idéias.*

*A Capes, pelo apoio financeiro.*

*A todos os animais sacrificados ao longo da pesquisa, o meu profundo respeito.*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VII</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1. Controle da ingestão de alimentos.....	01
2. Hormônios, metabólitos e neurotransmissores envolvidos no controle neural da ingestão alimentar em mamíferos.....	06
3. Serotonina e receptores envolvidos no controle neural da ingestão de alimentos em mamíferos.....	08
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
1. Animais.....	17
2. Implantação de cânulas no ARC e no LH.....	18
2.1 Cirurgia.....	18
2.2 Cânulas-guia.....	20
3. Injeções intracerebrais.....	20
4. Ambiente experimental.....	22
5. Protocolos experimentais.....	23
6. Categorias comportamentais registradas.....	26
7. Histologia.....	28
8. Análise estatística.....	29
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
1. Observações comportamentais em animais não-operados (NO) AL.....	30

2. Efeitos ingestivos e comportamentais da microinjeção local de Met, 8-OH ou Veículo no ARC, LH ou em AHA de ratos AL.....	31
3. Observações comportamentais em animais não-operados (NO) RA.....	41
4. Efeitos ingestivos e comportamentais da microinjeção local de Met, 8-OH ou Veículo no ARC, LH ou em AHA de ratos RA.....	42
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>63</b>

**Lista de abreviaturas**

<b>AgRP</b>	peptídeo relacionado ao gene cutia
<b>AH</b>	hipotálamo anterior
<b>AHA</b>	áreas hipotalâmicas adjacentes
<b>ARC</b>	núcleo arqueado do hipotálamo
<b>CART</b>	peptídeo regulado por cocaína e anfetamina
<b>CCK</b>	colecistocinina
<b>CRH</b>	hormônio liberador de corticotropina
<b>DMH</b>	núcleo dorsomedial do hipotálamo
<b>fx</b>	fornix
<b>GAL</b>	galanina
<b>GALP</b>	peptídeo semelhante à galanina
<b>HPA</b>	eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
<b>LH</b>	área hipotalâmica lateral
<b>Met</b>	N-CB2-8 $\beta$ -1,6-dimetilergolina-8-YL-metilamina
<b>MCH</b>	hormônio concentrador de melanina
<b>NPY</b>	neuropeptídeo Y
<b>PCPA</b>	para-clorofenilalanina
<b>PeF</b>	área perifornical
<b>PH</b>	área hipotalâmica posterior
<b>PMD</b>	núcleo pré-mamilar dorsal
<b>PMV</b>	núcleo pré-mamilar ventral
<b>POMC</b>	pro-opiomelanocortina
<b>PVN</b>	núcleo paraventricular do hipotálamo
<b>SNC</b>	sistema nervoso central
<b>VMH</b>	núcleo ventromedial do hipotálamo
<b>VTM</b>	núcleo tuberomamilar ventral
<b>ZI</b>	zona incerta
<b>3V</b>	3º ventrículo
<b>5-HT</b>	serotonina
<b>5,7-DHT</b>	5,7-dihidroxitamina
<b>8-OH</b>	8-hidroxi,2-di-n-propilamino-tetralina

## RESUMO

O presente trabalho descreve uma série de experimentos realizados com o objetivo de identificar efeitos ingestivos e comportamentais de microinjeções de Metergolina (Met - 20 nmol – antagonista não seletivo 5-HT<sub>1/2</sub>), 8-OH-DPAT (8-OH - 1,6 nmol - agonista 5-HT<sub>1A</sub>), ou de veículo (ácido ascórbico 5%) no ARC, LH ou em áreas hipotalâmicas adjacentes (AHA) de ratos alimentados livremente (AL) ou submetidos à restrição alimentar (RA). Durante 30 minutos após o tratamento, registrou-se a ingestão de água e alimento, além da duração, latência e frequência de comportamentos ingestivos e não-ingestivos. Em relação ao grupo AL, os dados mostram que injeções de Met no ARC, LH ou em AHA não modificam a ingestão de água e alimento, nem alteram qualquer dos comportamentos analisados, enquanto que as injeções de 8-OH aumentam a atividade de manutenção, quando administrado em AHA. Em contrapartida, nossos dados demonstram que as manipulações, incluindo a implantação da cânula-guia e a administração de veículo em qualquer dos núcleos testados, são capazes de provocar alterações comportamentais em relação aos animais não-operados (NO), como o aumento, da atividade locomotora e da imobilidade. Além disso, manipulações no ARC ou em AHA diminuem a atividade exploratória e aumentam a busca e a exploração do alimento, quando comparado aos animais NO. Já em relação ao grupo RA, os dados mostram que injeções de Met e 8-OH no ARC, LH ou em AHA, não modificam o consumo de água ou alimento. Injeções de Met no LH aumentam a imobilidade e a latência para iniciar a locomoção, além de diminuir a exploração do alimento. A administração de 8-OH neste mesmo núcleo diminui a atividade exploratória. No entanto, a administração de veículo no ARC, LH ou em AHA já é capaz de provocar alterações comportamentais. Injeções de veículo em qualquer das áreas estudadas aumentam a atividade de manutenção (auto-limpeza). Além disso, injeções no LH aumentam a atividade locomotora e a exploração do alimento, diminuindo a atividade exploratória do ambiente. Esta diminuição da atividade exploratória foi também observada em AHA. Em resumo, a administração de Met e de 8-OH no ARC e no LH de ratos, AL ou RA, não afeta a ingestão de água ou alimento, sugerindo a ausência de uma ação tônica inibitória, por parte da 5-HT, nesses sítios. Além disso, nossos dados indicam a participação de receptores 5-HT<sub>1/2</sub> na modulação de comportamentos não-ingestivos.

**ABSTRACT**

The objective of this study was to examine the ingestive and behavioral effects of Metergoline (Met - 20 nmol, non-selective 5-HT<sub>1/2</sub> antagonist), 8-OH-DPAT (8-OH – 1.6 nmol, 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist) or vehicle (5% ascorbic acid) microinjections into the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC), the lateral hypothalamic area (LH) or adjacent hypothalamic areas (AHA) in free feeding (AL) or food-restricted rats (RA). During 30 minutes after treatment, water and food intake, as well as the duration, latency and frequency of ingestive and non-ingestive behaviors were recorded. In the AL group, injections of Met in ARC, LH or in AHA left unchanged all of the analyzed behaviors, while the injections of 8-OH increased grooming, when administered in AHA. Experimental manipulation itself, including the implantation of guide cannula and the administration of vehicle at any tested nucleus, increase of the locomotion and immobility behavioral changes, as compared to non-operated animals (NO). These experimental manipulations in ARC or in AHA decreased the exploratory activity and increase the search for and the exploration of food, when compared to NO animals. In the RA group, injections of Met and 8-OH in ARC, LH or AHA did not change the water or food intake. Injections of Met in LH increased immobility and latency to begin locomotion, and decreased food exploration. The administration of 8-OH at the same sites decreased exploratory activity. Vehicle injections in any of the studied areas increased grooming and, particularly into the LH, these injections nonspecifically increased locomotion and food exploration, and decrease the environment exploration activity. This decrease of exploratory activity was also noticed in AHA. In summary, the administration of Met and 8-OH in ARC or LH of rats AL or RA, do not affect water or food intake, suggesting the absence of an inhibitory tonic action from the 5-HT in these sites.



## INTRODUÇÃO

### 1. Controle da ingestão de alimentos

A manutenção da vida requer um constante suprimento de fontes nutritivas para todo o corpo, utilizadas para gerar energia e preservar as estruturas corporais (Foster e McGarr, 1996). A produção desta energia é obtida através da ingestão de alimentos que é, na maioria das espécies, objeto de controle homeostático. Esse controle homeostático é um exemplo de um sistema regulatório muito preciso, já que a frágil e ainda persistente combinação entre ingestão e gasto energético diário poderiam levar, por si só, a alterações dramáticas no peso corporal (Strubbe e Dijk, 2002).

O sistema nervoso central (SNC) regula muitos aspectos da homeostasia energética. Esse processo é altamente complexo e envolve várias regiões cerebrais, estendendo-se do córtex ao tronco encefálico; entretanto, a estrutura neuronal mais estudada tem sido o hipotálamo (Williams *et al.*, 2001). Nele existe uma circuitaria, composta por redes neurais de elaboração e emissão de sinais anorexigênicos e orexigênicos, que ajustam os sinais relacionados ao apetite e saciedade. Os neurônios que produzem esses sinais moleculares estão sujeitos à modulação exercida por

estímulos sensoriais e por uma variedade de hormônios e metabólitos encontrados no meio interno (Kalra *et al.*, 1999).

Em 1940, Hetherington e Ranson descreveram que pequenas lesões eletrolíticas na região do hipotálamo ventromedial (VMH) provocavam hiperfagia e obesidade em ratos. Esta observação foi explicada através da hipótese de que os animais tornaram-se menos sensíveis aos sinais internos de saciedade, tornando-se, dessa forma, obesos. Anand e Brobeck, em 1951, foram os primeiros pesquisadores a sugerir que os neurônios do hipotálamo lateral (LH) poderiam participar da regulação do comportamento alimentar. Esses autores demonstraram que lesões eletrolíticas no LH resultavam em hipofagia, adipsia e perda de peso corporal em ratos e gatos.

Com base nesses dados, em 1954, Stellar postulou a chamada “Teoria do duplo centro”, pela qual o hipotálamo lateral seria responsável pela fome e o hipotálamo ventromedial seria responsável pela saciedade. Esta hipótese não foi totalmente descartada, mas tem sido considerada ultrapassada, visto que vários outros distritos hipotalâmicos e extra-hipotalâmicos estão também envolvidos no controle da ingestão de alimentos.

A participação de outros sítios hipotalâmicos como o núcleo dorsomedial (DMH) (Bernardis, 1987), núcleo paraventricular

(PVN) (Sclafani, 1977), o núcleo arqueado (ARC) (Chronwall, 1985), o núcleo supraquiasmático (Nagai *et al.*, 1978), além do VMH e do LH nos mecanismos neuronais que afetam a ingestão de alimentos foi indicada pelos resultados extraídos de estudos empregando técnicas de transecções cirúrgicas, de lesões ou de estimulação química de diferentes núcleos hipotalâmicos.

A importância dos neurônios do LH no controle do comportamento alimentar tem sido intensamente investigada. Por exemplo, os trabalhos de Mora e cols. (1976) e Rolls e cols. (1980) identificaram uma população de neurônios no LH de primatas que são ativados quando o animal vê o alimento, outra população que responde quando o animal sente o gosto do alimento, e outro agrupamento que responde com ambos, tanto à visão, como à gustação.

Além disso, alguns neurônios do LH são sensíveis ao cheiro dos alimentos (Oomura *et al.*, 1991), além de neurônios que respondem à variação nos níveis circulantes de substratos energéticos, como exemplo a glicose. O grupo neuronal sensível à glicose possui conexões com a área orbitofrontal do SNC e parece integrar estímulos quimiossensoriais internos. Em contrapartida, os neurônios insensíveis à glicose possuem conexões com o córtex motor e integram sinais de gustação e olfação (Nakamura *et al.*, 1989). Outro tipo de sensibilidade que os neurônios do LH

apresentam é ao ciclo claro-escuro, tendo em vista que esses neurônios disparam com mais frequência durante a fase escura, ou seja, período nos quais os ratos normalmente se alimentam (Ono *et al.*, 1986).

No LH estão presentes neurônios que contêm uma série de peptídeos diretamente relacionados com o controle da ingestão de alimentos e do peso corporal. Estudos recentes têm demonstrado a expressão desses peptídeos e seus receptores, principalmente na região perifornical do hipotálamo lateral (PeF), como são os casos do hormônio concentrador de melanina (MCH) (Kawano *et al.*, 2002), galanina (GAL) (Gundlach *et al.*, 2001), orexinas (Nambu *et al.*, 1999), pro-opiomelanocortina (POMC) (Roselli-Reh fuss *et al.*, 1993), peptídeo semelhante à galanina (GALP) (Takenoya *et al.*, 2003), peptídeo regulado por cocaína e anfetamina (CART) (Koylu *et al.*, 1997) e urocortinas (Richard *et al.*, 2000). Sabe-se que neurônios, principalmente orexinérgicos, da PeF e de áreas adjacentes como a zona incerta (ZI), participam na modulação de atividades locomotoras e na regulação do ciclo sono/vigília. Esses neurônios se projetam em direção a sítios localizados no tronco encefálico responsáveis pela manutenção do estado alerta e, através de uma atividade tônica excitatória, promovem a vigília além de modularem eventos fásicos do sono, como é o caso do sono paradoxal ou também chamado de sono REM (rapid eye movement)(Gerashchenko *et al.*, 2001; Saper *et al.*, 2001; Alam *et*

*al.*, 2002) Além disso, estes estudos afirmam que neurônios da PeF projetam-se também para núcleos como o ARC e o PVN, áreas de grande importância para o controle da ingestão alimentar.

O ARC tem ganhado destaque por ser um dos locais associados à integração hipotalâmica do balanço energético. Esta área contém uma densidade alta de neurônios sensíveis aos níveis circulantes de leptina, e que produzem peptídeos orexigênicos e anorexigênicos como, o neuropeptídeo Y (NPY) (Chronwall, 1985), peptídeo relacionado ao gene cutia (AgRP) (Hahn *et al.*, 1998), GAL (Merchenthaler *et al.*, 1993), POMC (Roselli-Rehfuss *et al.*, 1993), GALP (Larm *et al.*, 2000), CART (Koylu *et al.*, 1997), urocortinas (Richard *et al.*, 2000), além de GABA (Decavel *et al.*, 1990) e glutamato (Van den Pol *et al.*, 1990). É importante notar que estes neurônios se projetam a vários sítios extra-hipotalâmicos e intra-hipotalâmico, incluindo o LH, PVN e o núcleo supraquiasmático, e que todos esses neurotransmissores presentes no ARC estão envolvidos no controle da ingestão de alimentos em mamíferos.

Outros núcleos importantes como o PVN tem sido intensamente estudado quanto a sua associação com a regulação da ingestão de alimentos em mamíferos. Neste núcleo, estão presentes neurônios que expressam GAL (Gundlach *et al.*, 2001), CART (Koylu *et al.*, 1997), hormônio liberador de corticotropina

(CRH) (Richard *et al.*, 2000) e urocortinas (Lewis *et al.*, 2001). Em ratos, lesões neste núcleo resultam em hiperfagia e obesidade (Leibowitz *et al.*, 1981). Experimentos utilizando microinjeções de NPY (Stanley *et al.*, 1985), GAL (Kyrkouli *et al.*, 1990), orexinas (Dube *et al.*, 1998), GABA (Kelly e Grossman, 1980), noradrenalina e adrenalina no PVN (Leibowitz, 1978) mostraram que todas essas substâncias estimulam o consumo de alimentos. Por outro lado, é um núcleo particularmente sensível ao efeito inibitório induzido por agonistas de receptores 5-HT sobre a ingestão de alimentos (Hutson *et al.*, 1988a). Esse conjunto de resultados sugere que no PVN existem vários tipos de receptores envolvidos na modulação da ingestão de nutrientes.

## **2. Hormônios, metabólitos e neurotransmissores envolvidos no controle neural da ingestão alimentar em mamíferos.**

Além das informações sensoriais integradas no hipotálamo, a vasta circuitaria envolvida no controle da ingestão de alimentos utiliza um grande número de sinais metabólicos (glicose, mercaptoacetato, metilpalmoxirato) (Nicolaidis e Rowland, 1976; Smith e Gibbs, 1979; Bellin e Ritter, 1981; Rowland *et al.*, 1985; Rowland, 1991; Ritter *et al.*, 1994) e hormonais (insulina, glucagon, colecistocinina, amilina, bombesina, leptina) (McGowan *et al.*, 1992; Lutz *et al.*, 1995; Stuckey *et al.*, 1995; Rowland *et al.*, 1996; Satoh *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998; Woods e Stricker, 1999).

Esses fatores hormonais e metabólicos podem aumentar ou diminuir a ingestão de alimento, atuando no SNC, e são integrados por uma rede neuronal que utiliza uma variedade de neurotransmissores peptídeos (NPY, GAL, hipocretinas, orexinas, MCH, CRH) (Krahn *et al.*, 1984; Jhanwar-Uniyal *et al.*, 1993; Leibowitz, 1994; Rossi *et al.*, 1997; Sakurai *et al.*, 1998) e neurotransmissores não-peptídeos (catecolaminas, GABA, glutamato) (Kelly *et al.*, 1977; Oligiati *et al.*, 1980; Reddy *et al.*, 1986; Ritter e Stone, 1987; Leibowitz, 1988) que parecem contribuir para o controle neural do comportamento alimentar.

De particular importância para o presente trabalho é o papel de mecanismos serotoninérgicos que atuam nos circuitos de regulação da ingestão de alimentos. Inúmeras evidências se acumularam nas últimas décadas sugerindo que a serotonina exerça um papel importante nessa circuitaria. A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), os circuitos que a utilizam como mensageiro neuronal e os mecanismos celulares e receptores sobre as quais a 5-HT atua têm sido alvo de intensas investigações neurobiológicas, tanto a respeito de suas funções fisiológicas e comportamentais quanto em relação ao papel da 5-HT na psicopatologia e na farmacoterapia. Dessa maneira, o papel exercido pela 5-HT, no controle neural da ingestão de alimentos, será descrito a seguir.

### **3. Serotonina e receptores envolvidos no controle neural da ingestão de alimentos em mamíferos**

A primeira indicação do envolvimento da 5-HT no controle neural da ingestão de alimentos vem de estudos nos quais o uso do precursor da 5-HT, o aminoácido essencial triptofano, ou de 5-hidroxitriptofano ou de agonistas não seletivos como a quinpazina, causaram uma redução na ingestão de alimentos em ratos (Joyce e Mrosovsky, 1964; Fernstrom e Wurtman, 1972). Similarmente, vários autores descreveram que a depleção serotoninérgica induzida pelo inibidor da síntese de 5-HT, a para-clorofenilalanina (PCPA) ou pela toxina 5,7-dihidroxitamina (5,7-DHT), aumentou a ingestão de alimentos em ratos (Ferguson *et al.*, 1969).

Em humanos, a administração de agentes serotoninérgicos como dexfenfluramina (agonista serotoninérgico, que age aumentando a liberação e diminuindo a recaptação pré-sináptica da 5-HT) ou fluoxetina (antidepressivo com propriedades anoréticas que age inibindo a recaptação de 5-HT nas terminações sinápticas) induz à anorexia pelo aumento da disponibilidade sináptica de 5-HT. Ambos os compostos modificam o padrão de ingestão alimentar, diminuindo o tamanho da refeição (Leibowitz, 1988; Simansky, 1996), sugerindo que o aumento da transmissão serotoninérgica está mais envolvido com o fenômeno da saciação. Em 1977, Blundell propôs a hipótese de que a 5-HT seria um fator



de saciedade. Estudos posteriores, nos quais a administração de agonistas ou antagonistas serotoninérgicos foi efetuada tanto centralmente como periféricamente, comprovaram que a 5-HT exerce um papel inibitório sobre a ingestão de alimentos (Blundell, 1984; Curzon, 1990; Currie e Coscina, 1994a,b; Simansky, 1996). Desta forma, manipulações farmacológicas que reduzem a neurotransmissão serotoninérgica central, estimulam a ingestão de alimentos, enquanto que aumentos na atividade de circuitos centrais que liberam 5-HT inibem este comportamento (Blundell, 1986; Simansky, 1996; Weltzin *et al.*, 1994).

Os efeitos hipofágicos da 5-HT e de seus agonistas parecem ser mediados por alguns dos subtipos de receptores pré e pós-sinápticos presentes em circuitos hipotalâmicos (Bovetto e Richard, 1995; Glennon e Dukat, 1995; Samanin e Grignaschi, 1996). A descoberta de subtipos de receptores serotoninérgicos – 5-HT<sub>1</sub>(<sub>1a,1b,1d,1e,1f</sub>), 5-HT<sub>2</sub>(<sub>2a,2b,2c</sub>), 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>, e o desenvolvimento de ligantes que agem seletivamente sobre alguns deles, permitiram uma maior compreensão dos componentes serotoninérgicos envolvidos no mecanismo neural de controle da saciedade. Em linha com estes dados, um volume crescente de evidências aponta para a idéia de que alterações na atividade serotoninérgica central possam cumprir um importante papel na fisiopatologia de distúrbios da ingestão de alimentos em humanos, como obesidade, anorexia e bulimia, possibilitando a

indicação de novas drogas no tratamento destas desordens alimentares (Leibowitz, 1990a; Dourish, 1992; Weltzin *et al.*, 1994; Brewerton, 1995).

Dentre os diversos subtipos de receptores para a 5-HT, os receptores 5-HT<sub>1A</sub> têm recebido atenção particularmente intensa. Receptores 5-HT<sub>1A</sub> centrais podem estar localizados pós-sinapticamente aos terminais serotoninérgicos ou em corpos celulares de neurônios serotoninérgicos localizados no tronco cerebral (denominados receptores somato-dendríticos ou receptores pré-sinápticos). A ativação de receptores pré-sinápticos por um agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> hiperpolariza a membrana celular, acarretando uma redução nos disparos de neurônios serotoninérgicos, bem como a redução da síntese e liberação de 5-HT nos campos terminais destas células (Kreiss e Lucki, 1997; Martin *et al.*, 1999). Existem numerosas evidências de que a ativação destes auto-receptores, induzindo a uma diminuição da atividade serotoninérgica na fenda sináptica, provoca um aumento na ingestão de alimentos em mamíferos (Bendotti e Samanin, 1986; Gilbert e Dourish, 1987; Hutson *et al.*, 1988b; Leibowitz, 1990b,c; Voigt *et al.*, 1995; Simansky, 1996; Samanin e Grignaschi, 1996; Heslop e Curzon, 1999; Montgomery e Grottick, 1999; Sugimoto *et al.*, 1999; De Vry *et al.*, 2003).

O possível papel de receptores pós-sinápticos nos mecanismos de controle da ingestão de alimentos não têm sido investigado. Esta possibilidade têm sido reiteradamente sugerida em estudos recentes demonstrando a expressão de RNAm de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (usando métodos de hibridização *in situ*) em vários núcleos do hipotálamo de ratos (Pompeiano *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997; Gundlah *et al.*, 1999), núcleos estes que contêm neurônios com receptores 5-HT<sub>1A</sub>, de acordo com experimentos de binding usando o 8-OH-DPAT (8-hidroxi, 2-(di-n-propilamino)-tetralina - 8-OH), agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, como ligante (Pompeiano *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1997).

Mais recentemente, a distribuição de receptores 5-HT<sub>1A</sub> no hipotálamo de ratos foi descrita por métodos imunohistoquímicos (usando um anticorpo direcionado contra a terceira alça intracelular deste receptor) em experimentos de dupla marcação para uma série de peptídeos de grande importância para a regulação da ingestão de alimentos e do peso corporal (Collin *et al.*, 2002). Nestes experimentos, foi demonstrada a existência de receptores 5-HT<sub>1A</sub> em corpos celulares e dendritos de neurônios imunoreativos ao NPY, AgRP, POMC e ao CART, todos eles localizados no ARC. Esses experimentos reforçam também dados que indicam a 5-HT como um modulador inibitório da liberação de NPY no LH, hipotálamo anterior (AH) e principalmente nos núcleos ARC e PVN (Dryden *et al.*, 1996). No LH, receptores 5-HT<sub>1A</sub> foram

localizados em corpos celulares imunoreativos à orexinas, hipocretinas e ao hormônio MCH (Collin *et al.*, 2002). A presença de receptores para 5-HT no LH, principalmente no PeF, corroboram os estudos de Matsuzaki e cols. (2002), nos quais sugerem a participação de receptores 5-HT<sub>1/2</sub> na modulação de neurônios orexinérgicos. Estes neurônios, além de participarem no controle da ingestão de alimentos, estão envolvidos na regulação do ciclo sono/vigília e da atividade locomotora. Receptores 5-HT<sub>1A</sub> estão presentes também no PVN mediando a liberação de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), como o ACTH/corticotesterona e ocitocina (Bagdy, 1996). Estes peptídeos e distritos hipotalâmicos, como já citados, foram indicados nos anos recentes, como sendo cruciais para o controle da ingestão de alimentos, do metabolismo energético e do peso corporal (Palkovits, 1999; Watts, 2000; Funahashi *et al.*, 2003; Telles *et al.*, 2003).

Evidências encontradas na literatura reforçam a participação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no controle da ingestão de alimentos. A ativação desses receptores, provocada por intermédio da administração de 8-OH por vias periféricas, i.c.v ou diretamente nos núcleos mesencefálicos da rafe, de ratos alimentados livremente (AL), desencadeia hiperfagia (Dourish *et al.*, 1985a,b; Bendotti *et al.*, 1986, 1987; Hutson *et al.*, 1986a, 1988b; Ebenezer *et al.*, 1992a,b; Fletcher *et al.*, 1990a,b; Currie *et al.*, 1993). Estes

efeitos são provocados de forma dose-dependente e são atenuados por antagonistas seletivos de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, como o WAY-100135. Tais efeitos hiperfágicos são bloqueados pela depleção central de 5-HT após administração de PCPA ou de 5,7-DHT.

Outras pesquisas sugerem que a administração sistêmica de 8-OH em ratos AL reverte o efeito supressor da ingestão de alimentos causada pela colecistocinina (CCK) (Poeschla *et al.*, 1992) e diminui a 5-HT extracelular hipotalâmica (Voigt *et al.*, 2000). Já em ratos submetidos ao jejum, a administração sistêmica de 8-OH deprime a ingestão de alimentos, além de causar efeitos na locomoção desses animais (Bendotti *et al.*, 1987; Ebenezer *et al.*, 1992b). Este efeito paradoxal do 8-OH em diferentes estados nutricionais, foi demonstrado também em porcos, através de injeções intravenosas (Ebenezer *et al.*, 1999).

Coletivamente, estes dados sugerem que receptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos participam da mediação destes efeitos ingestivos. É importante notar que, em ratos, injeções de 8-OH nos núcleos dorsal e mediano da rafe provocam efeitos anti-conflito (Devry, 1995) em doses similares às que, no mesmo local, provocam aumentos na ingestão de alimentos (Fletcher e Coscina, 1993; Currie *et al.*, 1994b).

Outros indícios que sugerem a participação de receptores da família 5-HT<sub>1</sub> no controle da ingestão alimentar têm investigado o papel de circuitos serotoninérgicos a partir da administração de antagonistas de receptores para a 5-HT. Evidências mostram que administrações sistêmicas ou i.c.v de metergolina (N-CB2-[(8β)-1,6-Dimetilergolina-8-YL]-metilamina - Met), um antagonista inespecífico de receptores 5-HT<sub>1/2</sub>, em ratos saciados ou alimentados livremente, aumentam a ingestão de alimentos, sem alterar a ingestão de água e a atividade locomotora (Fletcher *et al.*, 1988; Stallone *et al.*, 1989a; Dourish *et al.*, 1989; Coscina *et al.*, 1994; Currie *et al.*, 1996). A administração de Met sistemicamente ou no PVN reverteu o efeito hipofágico causado por injeções de 5-HT no PVN (Weiss *et al.*, 1986; Leibowitz *et al.*, 1993; Currie *et al.*, 1996)

Além disso, a administração sistêmica de Met inibe a ação hipofágica da CCK (Stallone *et al.*, 1989b) em animais AL, enquanto que, em animais submetidos à restrição alimentar (RA), injeções sistêmicas de Met reverte o efeito hipofágico causado por outros agentes como, a d-fenfluramina e o RU24969, agonista 5-HT<sub>1B</sub> (Bendotti *et al.*, 1987; Samanin *et al.*, 1989). Este efeito inibitório da Met sobre a ação hipofágica causada por injeções periféricas de d-fenfluramina foram também observadas em humanos (Goodall *et al.*, 1988).

As respostas hiperfágicas às injeções de 8-OH e de Met descritas acima, não só reforçam o papel inibitório da 5-HT, mas também indicam a existência de uma ação tônica inibitória em circuitos serotoninérgicos sobre o controle da ingestão de alimentos. Como vimos, o bloqueio dessa atividade tônica inibitória, induzindo aumento na ingestão de alimentos, foi demonstrado a partir de injeções de 8-OH nos núcleos da rafe (Bendotti *et al.*, 1986; Hutson *et al.*, 1986a; Fletcher *et al.*, 1990a,b; Currie *et al.*, 1993) ou de Met na amígdala posterior (Parker *et al.*, 2001b). No entanto, o bloqueio da ação tônica inibitória da 5-HT através da administração de antagonistas, como a Met, no PVN não alteram a ingestão em ratos (Coscina *et al.*, 1994; Currie *et al.*, 1996), sugerindo que esta ação tônica da 5-HT não atue neste sítio. Por outro lado, sabemos que outros núcleos hipotalâmicos, como o ARC e o LH, participam do controle da ingestão em ratos. Além disso, sabe-se que neurônios destes sítios hipotalâmicos contêm receptores 5-HT<sub>1A</sub>. No momento, não sabemos se essa atividade tônica inibitória ocorre em outras regiões hipotalâmicas relevantes no controle da ingestão de alimentos. Então, no presente trabalho procuramos investigar a possível participação de receptores para a 5-HT, localizados no ARC ou LH, no controle do consumo de alimentos, em ratos submetidos a diferentes estados nutricionais (restritos de alimento ou alimentados livremente). Para isso, foram realizados registros comportamentais e ingestivos nesses animais, após a administração local de 8-OH-DPAT, um agonista de

receptores 5-HT<sub>1A</sub>, ou de Metergolina, um antagonista de receptores 5-HT<sub>1/2</sub>, nestas regiões hipotalâmicas.



## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Animais

Todos os experimentos foram feitos no Laboratório de Neurofisiologia Comparada, e foram realizados respeitando-se os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1991) e aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UFSC (Protocolo 284 – 07/07/04). Foram utilizados 163 ratos (*Rattus norvegicus*) machos, adultos, da linhagem Wistar, com peso corporal variando entre 220-280g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurofisiologia Comparada, localizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS/CCB) da UFSC, em caixas coletivas de polipropileno (49 x 34 x 16 cm) forradas com maravalha, dispondo de água e ração (Fri-Lab) *ad libitum*. A iluminação foi mantida artificialmente, através de lâmpadas fluorescentes com ciclo claro/escuro de 12/12 horas (período de escuro iniciando-se às 19 horas) e a temperatura foi mantida entre 22 e 25°C. Os animais foram retirados das caixas coletivas e postos em caixas individuais, de proporções idênticas às caixas coletivas, dois dias antes da cirurgia de implantação da cânula-guia. Após a cirurgia, os animais permaneceram por sete dias até o início dos testes

experimentais. Durante este período, 99 animais foram mantidos em um regime de restrição alimentar (RA - 15g de ração por dia) e 64 animais foram mantidos em um regime de alimentação livre (AL). Além disso, todos os animais foram expostos ao ambiente experimental, com água e comida, por 30 minutos para que houvesse adaptação ao procedimento experimental, durante este período. Esta adaptação (7 dias) pareceu ser suficiente em estabilizar a ingestão de alimentos nos animais expostos a ambientes e/ou regimes nutricionais diferentes, conforme experimentos com curvas de ingestão realizados em nosso laboratório (dados não apresentados no presente trabalho).

## **2. Implantação de cânulas no ARC e no LH**

### **2.1 Cirurgia**

Para a implantação das cânulas-guia, os ratos foram anestesiados com uma mistura de xilazina/quetamina (13mg/Kg e 87mg/Kg, respectivamente) injetada por via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram adaptados ao aparelho estereotáxico tendo a cabeça fixada por intermédio de barras posicionadas no conduto auditivo e no focinho. Previamente (2 minutos antes) à incisão no escalpo, a região onde o campo cirúrgico se encontra foi infiltrada subcutaneamente com 0,4 ml de xilestesina (Cloridrato de lidocaína a 2%, com adrenalina, anestésico local).

Após a assepsia com álcool iodado, uma incisão longitudinal foi realizada no escalpo, de tal forma a expor a calota craniana. A porção exposta do crânio foi raspada e seca para garantir a adesão do acrílico. Em seguida, foi marcada a posição para a perfuração e implantação da cânula-guia. Na posição determinada, foi feito um orifício no crânio possuindo cerca de 0,5 mm de diâmetro, com auxílio de uma broca esférica de uso odontológico. A seguir, a cânula-guia (0,44 mm de diâmetro externo e 15 mm de comprimento) foi posicionada 3 mm acima da região de interesse. Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam uma injeção intramuscular (0,1ml/Kg de peso) de pentabiótico veterinário, a título de profilaxia para possíveis infecções decorrentes da cirurgia.

As coordenadas utilizadas para a implantação de cânulas-guia no ARC e no LH, derivadas do Atlas de Paxinos e Watson (1998), foram:

### **ARC**

Plano frontal – 5,2 mm anterior à linha interaural.

Plano sagital – 0,2 mm lateral à sutura sagital.

Plano horizontal – 7,8 mm abaixo da calota craniana.

### **LH**

Plano frontal – 5,4 mm anterior à linha interaural.

Plano sagital – 1,2 mm lateral à sutura sagital.

Plano horizontal – 7,8 mm abaixo da calota craniana.

## **2.2 Cânulas-guia**

As cânulas-guia foram confeccionadas a partir de agulhas, com 0,44 mm de diâmetro externo e 15 mm de comprimento. Para evitar o contato do acrílico com o tecido cerebral, o orifício foi coberto com fibrina (Fibrinol – Baldacci). A cânula foi fixada à calota craniana por meio de parafusos de aço inoxidável, distribuídos ao redor do orifício, e foi cercada por um tubo de polietileno, com 90 mm de diâmetro externo e 1 cm de comprimento. O conjunto foi então envolvido por acrílico autopolimerizável, formando um conjunto sólido capaz de resistir aos eventuais choques mecânicos com a caixa e a manipulação para injeções. Em cada cânula-guia, foi ajustado um mandril de aço inoxidável revestido com politetrafluoreto (Teflon®), para evitar sua obstrução.

## **3. Injeções intracerebrais**

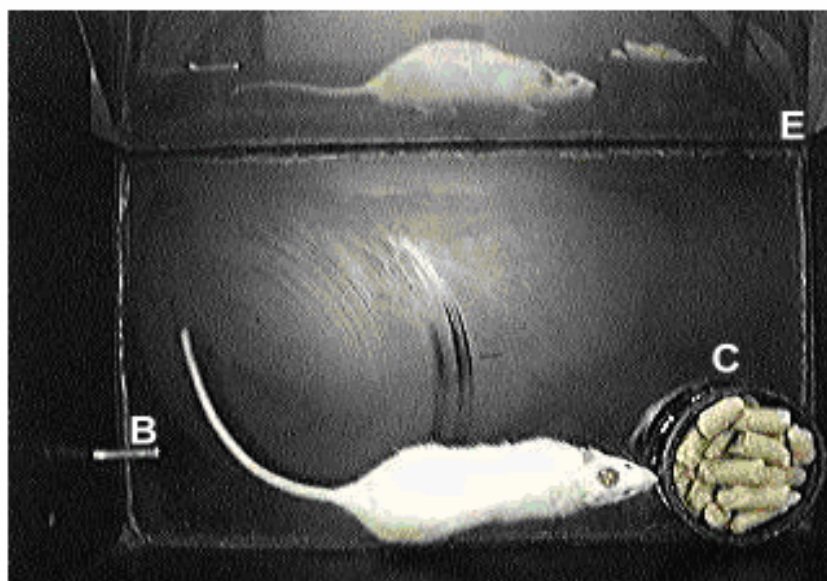
As injeções intracerebrais no ARC, LH e em áreas hipotalâmicas adjacentes (AHA) foram realizadas por meio de uma agulha injetora, de 0,2 mm de diâmetro externo, introduzida na cânula-guia e conectada por um tubo de polietileno a uma micro-

seringa Hamilton de 1µl. As agulhas excederam o tamanho da cânula-guia em 3 mm, nos animais canulados no ARC, e 1,5 mm, nos animais canulados no LH. Os animais receberam, em cada um dos sítios hipotalâmicos, o tratamento com 8-OH, Met ou veículo (ácido ascórbico 5%), numa seqüência aleatória. Com o objetivo de minimizar variações na pressão intracerebral, as soluções foram administradas no período de 2 minutos, sendo 1 minuto para a injeção da solução e 1 minuto de espera com êmbolo da micro-seringa fixado, para minimizar o refluxo.

As drogas administradas (8-OH e Met) foram adquiridas da SIGMA (Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) e todas as soluções foram administradas em um volume de 200 nl nos animais AL e nos animais RA. A solução de 8-OH foi dissolvida em uma solução de ácido ascórbico a 5%, na concentração de 1,6 nmol. Essa concentração pareceu ser eficaz em alterar a ingestão de alimentos quando injetada nos núcleos da rafe de ratos (Currie *et al.*, 1993). A solução de Met foi dissolvida em uma solução de ácido ascórbico a 5%, na concentração de 20 nmol. Essa concentração também demonstrou eficácia em alterar a ingestão de alimentos quando injetada no PVN de ratos (Currie *et al.*, 1996) e na amígdala posterior de ratas (Parker *et al.*, 2001b). Para o controle dos tratados foi administrado apenas a solução veículo, composta por uma solução de ácido ascórbico 5%.

#### **4. Ambiente experimental**

O ambiente experimental, utilizado para o registro comportamental e ingestivo, consiste em uma caixa de vidro (30 x 50 x 50 cm) com todos os lados recobertos internamente com papel plástico adesivo preto (CONTACT<sup>®</sup>), exceto uma das paredes laterais da caixa (50 x 50 cm). Neste lado, foi acoplado um espelho (com dimensões idênticas) na parte externa da caixa num ângulo menor que 45 graus, que não permite que o animal veja sua própria imagem no espelho. Acima da caixa, foi posicionada uma câmera web cam (CREATIVE<sup>®</sup>) ligado por um cabo (USB) em um microcomputador para o registro do animal durante o experimento. Desta forma, permite ao observador a visualização dos comportamentos apresentados pelo animal por dois campos de visualização, por cima (câmera) e de perfil (espelho). Além disso, no espaço interno da caixa está contido um bebedouro e um comedouro acoplados, que permite o registro ingestivo durante o experimento. Os vídeos com duração de 30 minutos, registrados em cada experimento, foram gravados no microcomputador e ao final de cada experimento, foram transferidos para um CD (Compact Disc) para posterior análise comportamental.



**Figura 1.** Fotografia do ambiente experimental com o animal presente, utilizada no registro alimentar e comportamental tirada pela câmera web cam. **B:** bebedouro, **C:** comedouro, **E:** espelho.

## 5. Protocolos experimentais

Os procedimentos experimentais foram iniciados ao final de sete dias após a cirurgia da implantação da cânula-guia e sempre foram realizados entre 13:00 e 17:00 horas.

**Protocolo experimental 1** – Efeitos comportamentais e ingestivos da microinjeção de 8-OH, Met ou Veículo, no ARC, LH e em AHA, de ratos AL:

Foram utilizados 31 ratos machos pesando entre 220 – 280 g. Após a implantação da cânula-guia, os animais permaneceram

por 7 dias até o início dos testes experimentais. Durante este período, os animais foram expostos todos os dias ao ambiente experimental, para a habituação, e mantidos em um regime de livre acesso a água e a comida. Após este período, os animais foram submetidos a três sessões experimentais, uma para cada tratamento, de forma aleatória e com intervalos de 72 horas entre elas. Imediatamente após o tratamento, os animais foram colocados no ambiente experimental, porém sem a apresentação de água e alimento. Após os primeiros 10 minutos, foi disponibilizada a eles uma quantidade de água e ração previamente pesadas e o registro em vídeo por 30 minutos foi iniciado. Ao fim deste tempo, os animais foram recolocados em suas caixas individuais e voltaram ao biotério; a ração e a água restante na caixa experimental foram pesadas e o consumo de alimento e água foi medido pela diferença entre a quantidade inicial e final. Com o objetivo de evitar pistas odoríferas, após cada teste, a caixa experimental foi limpa com tecido umedecido em solução de etanol 20% antes de seu uso por outros animais.

**Protocolo experimental 2** – Dados comportamentais e ingestivos de ratos normais (não submetidos a procedimento cirúrgico) AL:

Foram utilizados 33 ratos machos pesando entre 220 – 280 g. Esses animais foram retirados das caixas coletivas e postos em



caixas individuais, 9 dias antes do início dos testes experimentais, sem serem submetidos a nenhum procedimento cirúrgico. Em seguida, as etapas foram idênticas às já descritas no protocolo experimental 1.

**Protocolo experimental 3** – Efeitos comportamentais e ingestivos da microinjeção de 8-OH, Met ou Veículo, no ARC, LH e em AHA, em ratos RA:

Foram utilizados 54 ratos machos pesando entre 220 – 280 g. Após a implantação da cânula-guia, os animais permaneceram por 7 dias até o início dos testes experimentais. Durante este período, os animais foram expostos todos os dias ao ambiente experimental, para a habituação, e mantidos em um regime de restrição alimentar (15 g ração/rato ao dia) com água *ad libitum*. Vale lembrar que as 15 g de ração foram ofertadas na habituação, durante este período de 7 dias. Após este período, os animais foram submetidos a três sessões experimentais, uma para cada tratamento, de forma aleatória e com intervalos de 72 horas entre elas. Imediatamente após o tratamento, os animais foram colocados no ambiente experimental, porém sem a apresentação de água e alimento. Após os primeiros 10 minutos, foi disponibilizada a eles uma quantidade de água e ração previamente pesadas e o registro em vídeo por 30 minutos foi iniciado. Ao fim deste tempo, os animais foram recolocados em

suas caixas individuais e voltaram ao biotério; a ração e a água restante na caixa experimental foram pesadas e o consumo de alimento e água foi medido pela diferença entre a quantidade inicial e final. Com o objetivo de evitar pistas odoríferas, após cada teste, a caixa experimental foi limpa com tecido umedecido em solução de etanol 20% antes de seu uso por outros animais.

**Protocolo experimental 4 – Dados comportamentais e ingestivos de ratos normais (não submetidos a procedimento cirúrgico) RA:**

Foram utilizados 45 ratos machos pesando entre 220 – 280 g. Esses animais foram retirados das caixas coletivas e postos em caixas individuais, 9 dias antes do início dos testes experimentais, sem serem submetidos a nenhum procedimento cirúrgico. Em seguida, as etapas foram idênticas às já descritas no protocolo experimental 3.

## **6. Categorias comportamentais registradas**

A categorização comportamental teve como objetivo verificar se uma possível alteração na ingestão de alimento ou de água não seria consequência de modificações no quadro comportamental apresentado pelo animal.

Para analisar os registros comportamentais, cada vídeo gravado em um teste experimental foi assistido por estagiários treinados em nosso laboratório, utilizando o software Windows Media Player®, que registravam, em planilhas comportamentais, a duração, a latência e a frequência para os comportamentos ingestivos e não-ingestivos, cuja descrição é apresentada a seguir.

1. **Comer (c):** quando o animal estiver efetivamente ingerindo alimento sólido, com comportamentos característicos de deglutição;
2. **Beber (b):** quando o animal se aproxima do bebedouro e lambe sua ponta;
3. **Exploração do alimento (ec):** quando o animal cheira ou manipula a ração, sem ingeri-la;
4. **Exploração do ambiente (ex):** quando o animal estiver ativamente explorando o ambiente com a cabeça, seja cheirando o ar ou o chão, podendo se locomover lentamente sobre a caixa experimental;
5. **Exploração vertical (r):** quando o animal estiver explorando o ambiente apoiado somente nas patas traseiras, estando as patas dianteiras livres e não apoiadas no fundo da caixa (ereto), correspondendo ao comportamento citado na literatura como “rearing”;

6. **Manutenção** (m): quando o animal apresentar comportamentos típicos de auto-limpeza, como: lavar a cabeça, limpar as unhas, coçar o corpo, correspondendo ao comportamento citado na literatura como “grooming”;
7. **Locomoção** (l): quando o animal estiver deambulando pela caixa, sem apresentar qualquer outro dos comportamentos já citado;
8. **Imobilidade** (p): quando o animal permanecer imóvel, sem apresentar qualquer outro comportamento já citado.

## 7. Histologia

Após completarem o esquema experimental, os animais receberam uma dose letal de solução anestésica de Equitesin (2,5 ml por via intraperitoneal), e então foram perfundidos transcardialmente com salina 0,9%, seguido de formol 10%. Logo após, os cérebros foram dissecados e permaneceram imersos em formol 10% por um período de 5 a 7 dias, sendo então, cortadas no plano frontal em fatias de 100 µm de espessura em um vibrátomo. Os cortes foram então montados em lâminas de vidro tratadas com gelatina e alúmen-cromo, e permaneceram secando em temperatura ambiente por cerca de uma semana. Ao final, os cortes foram corados pelo método de Nissl, tratados com uma série

de álcool em concentrações de 70%, 95% e 100%, clareados em xilol e cobertos com lamínulas. Eles tiveram como meio de montagem o DPX (Aldrich Chemical Company. Inc). A reprodução gráfica dos cortes e dos pontos de injeção analisados ao microscópio foi realizada sobre diagramas copiados do Atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1998).

## **8. Análise estatística**

Os dados do tratamento Veículo em cada área hipotalâmica estudada (ARC, LH, AHA) e os dados dos animais normais (não-operados), foram comparados estatisticamente por intermédio de uma análise de variância de uma via (ANOVA), enquanto que, os dados dos tratamentos (Met, 8-OH, veículo) nas diferentes áreas hipotalâmicas, foram comparados estatisticamente por intermédio de uma análise de variância de duas vias, tendo como fatores os efeitos comportamentais e ingestivos e os diversos tratamentos realizados nos diferentes sítios hipotalâmicos. A comparação entre os grupos foi realizada aplicando-se o teste de Newman-Keuls seguido pelo teste de Duncan. O nível de significância adotado em todas as análises foi  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### 1. Observações comportamentais em animais não-operados (NO) AL.

Foi utilizado um total de 33 ratos submetidos ao mesmo protocolo experimental, de forma idêntica aos animais operados e tratados.

A análise comportamental mostrou que esses animais, durante o período de 30 minutos observado, apresentaram comportamentos exploratórios por mais de 50% do tempo, e comportamentos ingestivos por volta de 10% do tempo total. Além disso, esses animais apresentaram, em média, uma latência alta ( $1331,9 \pm 105,3$  segundos) para iniciar a ingestão de alimentos, sendo observados o consumo de água e alimento, somente após 75% do período total de observação ter transcorrido.

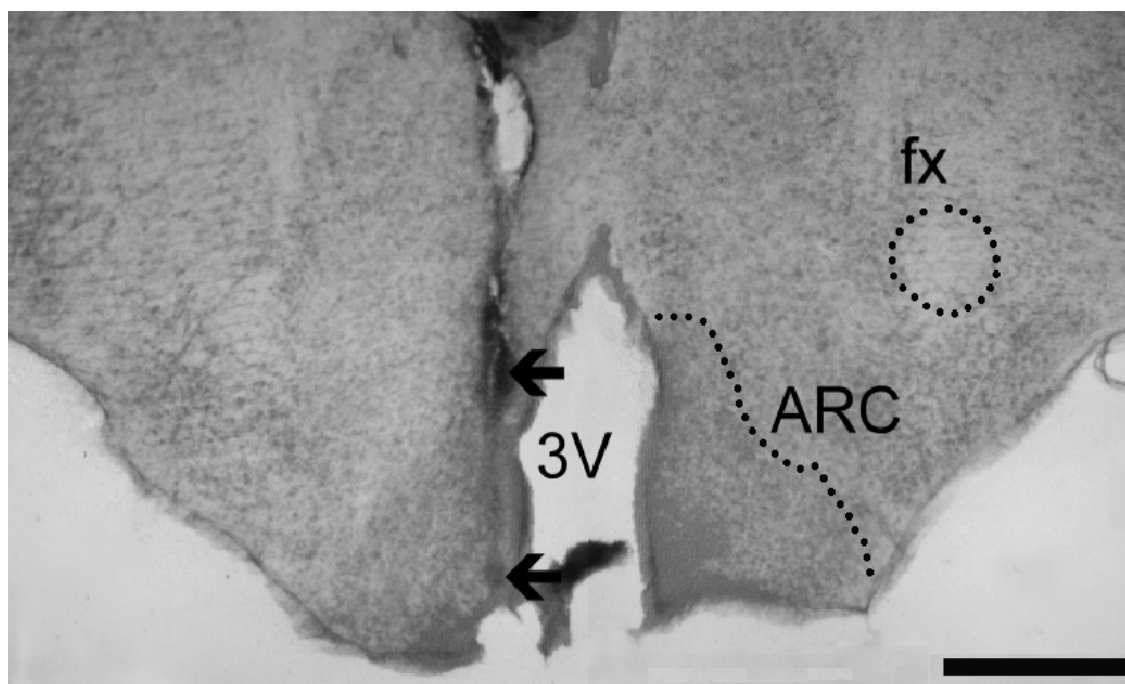
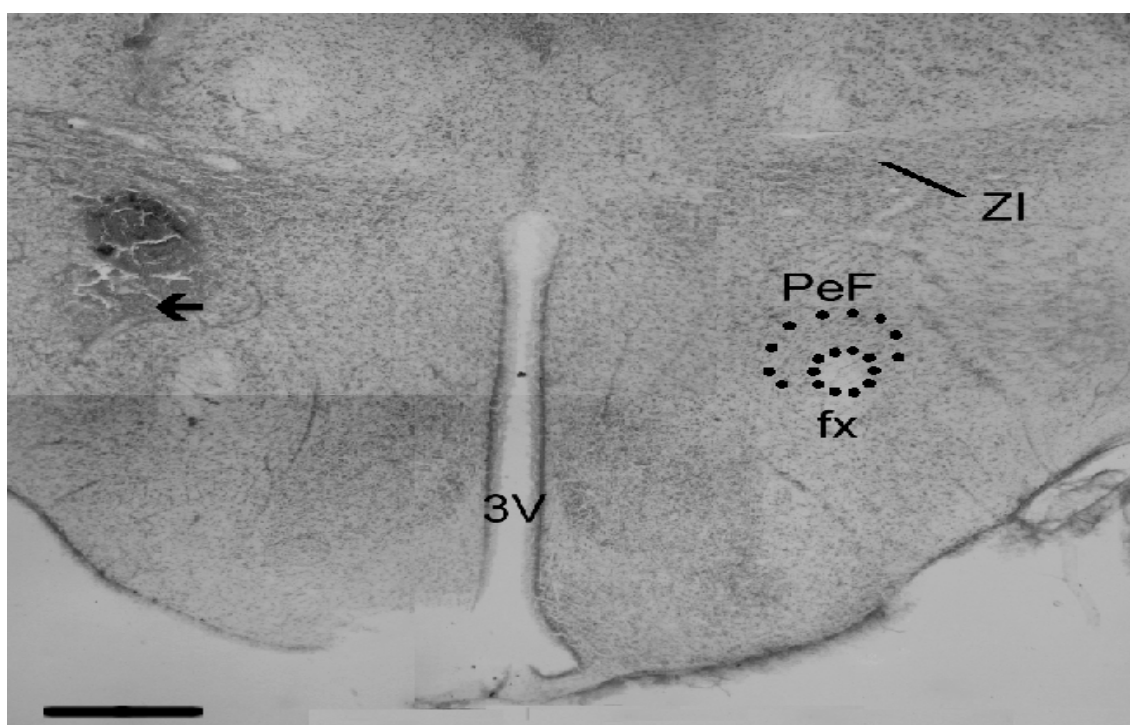
Quanto à quantidade de alimento e água ingeridos, em média, esses animais comeram  $0,25 \pm 0,05$  gramas de ração por 100 g de peso corpóreo em 30 minutos, chegando a consumir  $0,6 \pm 0,1$  g ao final de 2 horas, e beberam  $0,15 \pm 0,09$  g de água por 100 g de peso corpóreo em 30 minutos, chegando a  $1,0 \pm 0,2$  g em 2 horas (tab. 1).

## **2. Efeitos ingestivos e comportamentais da microinjeção local de Met, 8-OH ou Veículo no ARC, LH ou em AHA de ratos AL.**

Do total de 31 ratos canulados AL, 16 animais receberam injeções no ARC, 10 animais receberam injeções no LH e 5 animais receberam injeções em AHA (Fig.2 e 3).

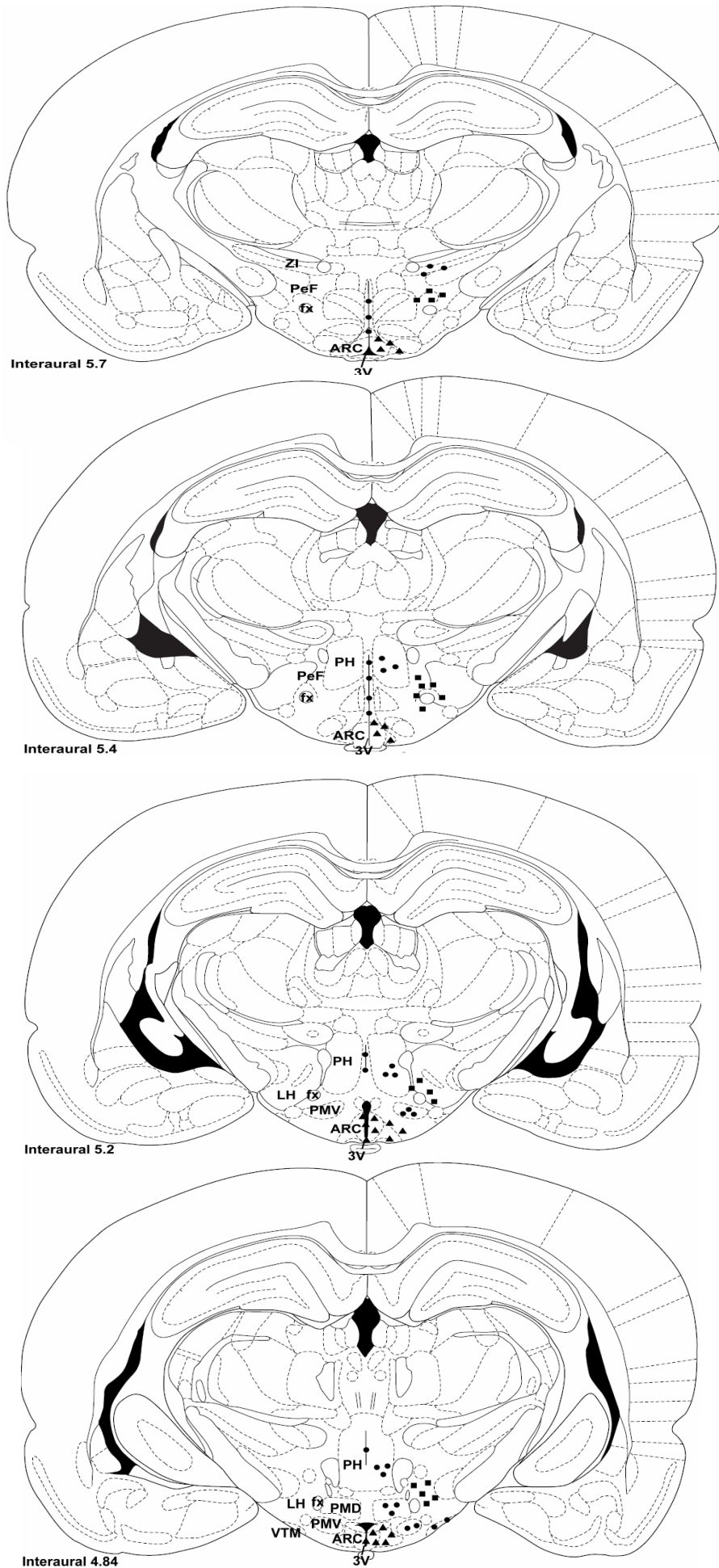
A microinjeção de veículo em todos os sítios hipotalâmicos estudados não altera a ingestão de alimentos (ARC:  $0,4 \pm 0,1$  g; LH:  $0,16 \pm 0,07$  g; AHA:  $0,4 \pm 0,1$  g; NO:  $0,25 \pm 0,05$  g) ou a ingestão de água (ARC:  $0,27 \pm 0,14$  g; LH:  $0,0 \pm 0,0$  g; AHA:  $0,1 \pm 0,04$  g; NO:  $0,15 \pm 0,09$  g), nem mesmo a duração, latência e a frequência destes comportamentos ingestivos, quando comparado aos animais NO (Tab. 1). No entanto, a administração de veículo em todos os sítios hipotalâmicos estudados, aumentou a frequência de atividade locomotora [ARC:  $F(1,47)=7,5$ ;  $p=0,008$ ; LH:  $F(1,39)=20,4$ ;  $p=0,00005$ ; AHA:  $F(1,36)=25,6$ ;  $p=0,00001$ ] e diminuiu a latência para iniciar este comportamento [LH:  $F(1,39)=5,5$ ;  $p=0,02$ ; AHA:  $F(1,36)=10,8$ ;  $p=0,002$ ], quando comparado com os animais NO (Tab. 2).

Além disso, foi observado um aumento na frequência [ARC:  $F(1,47)=10,4$ ;  $p=0,002$ ; LH:  $F(1,39)=15,5$ ;  $p=0,0003$ ] e uma diminuição da latência para imobilidade [ARC:  $F(1,47)=11,5$ ;

**A****B**

**Figura 2.** Fotomicrografias de cortes coronais do hipotálamo de ratos ilustrando os pontos de injeção. Em **A** está representado um corte a 5,2 mm da linha interaural, ilustrando o ARC. Em **B** está representado um corte a 5,4 mm da linha interaural, ilustrando o PeF no LH. As setas indicam os pontos de injeção. Barra de escala: 500  $\mu$ m. Ver lista de abreviaturas.





**Figura 3.** Desenhos semi-esquemáticos de cortes coronais do hipotálamo de ratos, representando os locais de injeções de Met, 8-OH ou veículo em animais AL e RA. (▲) ARC, (■) LH, (●) AHA. Ver lista de abreviaturas.

**Tabela 1.** Ingestão de alimento, água e comportamentos ingestivos de animais alimentados livremente. Comparação entre animais não-operados (NO) e animais submetidos a injeções de veículo no ARC, LH ou em AHA

	NO (n=33)	Veículo - ARC (n=16)	Veículo - LH (n=10)	Veículo - AHA (n=5)
<b>Ingestão de alimento (g)</b>	0,25 ± 0,05	0,4 ± 0,1	0,16 ± 0,07	0,4 ± 0,1
<b>Ingestão de água (g)</b>	0,15 ± 0,09	0,27 ± 0,14	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,04
<b>COMER</b>				
Duração (s)	133,3 ± 30,7	227,1 ± 65,0	65,8 ± 31,4	307,8 ± 131,3
Latência (s)	1331,9 ± 105,3	1080,9 ± 182,9	1126,0 ± 246,4	885,8 ± 264,1
Frequência (e)	1,7 ± 0,4	2,9 ± 0,9	1,8 ± 0,8	4,2 ± 1,3
<b>BEBER</b>				
Duração (s)	11,3 ± 7,4	35,4 ± 16,1	0,0 ± 0,0	19,2 ± 12,0
Latência (s)	1540,8 ± 88,5	1354,5 ± 179,8	1800,0 ± 0,0	1208,6 ± 328,3
Frequência (e)	0,7 ± 0,2	1,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	2,2 ± 1,5
<b>EXP. ALIMENTO</b>				
Duração (s)	38,6 ± 8,0	63,0 ± 13,4	61,4 ± 19,7	80,0 ± 15,8
Latência (s)	768,7 ± 127,6	129,0 ± 48,2 <sup>*</sup>	600,7 ± 239,9	32,8 ± 21,2 <sup>*</sup>
Frequência (e)	4,9 ± 0,9	10,0 ± 1,8 <sup>*</sup>	5,4 ± 1,3	14,4 ± 2,1 <sup>*</sup>

Todos os dados estão representados em média ± erro padrão da média. (g) gramas; (s) segundos; (e) n°. de eventos. (\*) p < 0,05 (ANOVA) em relação aos NO.

**Tabela 2.** Comportamentos não – ingestivos de animais alimentados livremente. Comparação entre animais não-operados (NO) e animais submetidos a injeções de veículo no ARC, LH ou em AHA.

	NO (n=33)	Veículo - ARC (n=16)	Veículo - LH (n=8)	Veículo - AHA (n=5)
<b>EXP. AMBIENTE</b>				
Duração (s)	831,6 ± 48,1	638,2 ± 67,9 <sup>*</sup>	856,7 ± 126,6	539,8 ± 66,1 <sup>*</sup>
Latência (s)	3,5 ± 2,9	0,8 ± 0,6	2,7 ± 2,7	0,0 ± 0,0
Frequência (e)	48,2 ± 3,0	45,3 ± 4,6	45,6 ± 7,7	44,0 ± 5,6
<b>EXP. VERTICAL</b>				
Duração (s)	174,9 ± 18,4	83,6 ± 18,9 <sup>*</sup>	117,2 ± 37,4	72,8 ± 35,1 <sup>*</sup>
Latência (s)	24,9 ± 5,6	34,0 ± 10,5	270,0 ± 219,2 <sup>*</sup>	49,0 ± 24,9
Frequência (e)	31,0 ± 2,6	20,4 ± 4,1 <sup>*</sup>	24,5 ± 5,5	16,4 ± 5,7 <sup>*</sup>
<b>LOCOMOÇÃO</b>				
Duração (s)	1,4 ± 0,55	4,1 ± 2,0	2,5 ± 0,8	4,4 ± 2,4
Latência (s)	1347,4 ± 117,6	1135,2 ± 194,2	708,9 ± 262,3 <sup>*</sup>	299,6 ± 247,1 <sup>*</sup>
Frequência (e)	0,4 ± 0,1	3,2 ± 1,4 <sup>*</sup>	2,1 ± 0,7 <sup>*</sup>	3,4 ± 1,5 <sup>*</sup>
<b>IMOBILIDADE</b>				
Duração (s)	200,4 ± 67,9	373,6 ± 114,1	430,5 ± 194,9	395,8 ± 224,8
Latência (s)	1359,6 ± 118,4	656,7 ± 169,5 <sup>*</sup>	316,0 ± 125,7 <sup>*</sup>	801,6 ± 302,2
Frequência (e)	1,7 ± 0,55	5,8 ± 1,4 <sup>*</sup>	7,1 ± 1,6 <sup>*</sup>	4,6 ± 2,2
<b>MANUTENÇÃO</b>				
Duração (s)	394,5 ± 46,6	374,8 ± 49,3	247,0 ± 33,5	385,8 ± 57,0
Latência (s)	120,5 ± 25,5	111,6 ± 16,2	262,4 ± 112,4	132,8 ± 40,8
Frequência (e)	15,1 ± 1,5	16,2 ± 2,0	15,0 ± 3,1	15,4 ± 3,3

Todos os dados estão representados em média ± erro padrão da média. (s) segundos; (e) n° de eventos. (<sup>\*</sup>) p < 0,05 (ANOVA) em relação aos NO.

$p=0,001$ ; LH:  $F(1,39)=17,4$ ;  $p=0,0001$ ] em animais que receberam injeções de veículo no ARC ou LH (Tab. 2). Em animais cujas injeções foram no ARC ou AHA, a administração de veículo diminuiu significativamente, a duração da exploração do ambiente [ARC:  $F(1,47)=5,3$ ;  $p=0,02$ ; AHA:  $F(1,36)=5,2$ ;  $p=0,02$ ], a duração da exploração vertical [ARC:  $F(1,47)=9,4$ ;  $p=0,003$ ; AHA:  $F(1,36)=4,2$ ;  $p=0,04$ ], a frequência da exploração vertical [ARC:  $F(1,47)=5,3$ ;  $p=0,02$ ; AHA:  $F(1,36)=4,4$ ;  $p=0,04$ ] (Tab. 2) e a latência para explorar o alimento [ARC:  $F(1,47)=11,6$ ;  $p=0,001$ ; AHA:  $F(1,36)=4,9$ ;  $p=0,03$ ], além de aumentar a frequência de exploração do alimento [ARC:  $F(1,47)=7,8$ ;  $p=0,007$ ; AHA:  $F(1,36)=13,8$ ;  $p=0,0006$ ] (Tab. 1). A administração de veículo no LH também provocou aumento na latência para iniciar a exploração vertical [ $F(1,39)=5,5$ ;  $p=0,02$ ], quando comparado com os animais NO (Tab. 2).

A microinjeção de Met em qualquer dos sítios hipotalâmicos estudados, não modificou o consumo de alimentos nem a ingestão de água (Tab. 3; Fig. 4 e 5), como também não foi capaz de provocar alterações significativas na duração, latência e frequência de comportamentos ingestivos e não-ingestivos, quando comparado com a administração de veículo (Tab. 3 e 4).

De forma semelhante ao que ocorreu nos animais quando administrado Met, microinjeções de 8-OH no ARC, LH ou em AHA

de animais AL, não alterou a ingestão de alimentos, nem a ingestão de água, quando comparados aos tratamentos de veículo (Tab. 3; Fig. 4 e 5). Também não foram vistas diferenças significantes na duração, latência e na frequência de comportamentos ingestivos. A administração de 8-OH em AHA aumentou, a duração da manutenção [ $F(2,81)=1,1$ ;  $p=0,002$ ] e a latência para locomoção [ $F(2,81)=2,3$ ;  $p=0,01$ ], quando comparado com a administração de veículo (Tab. 4).

Em resumo, injeções de Met no ARC, LH ou em AHA de ratos AL não modificaram a ingestão de água e alimento, nem alteraram qualquer dos comportamentos analisados, enquanto que as injeções de 8-OH aumentaram a atividade de manutenção, quando administrado em AHA. Em contrapartida, nossos dados demonstram que as manipulações, incluindo a implantação da cânula-guia e a administração de veículo em qualquer dos núcleos testados, são capazes de provocar diversas alterações comportamentais em relação aos animais NO, como o aumento, da atividade locomotora e da imobilidade. Além disso, manipulações no ARC ou em AHA diminuíram a atividade exploratória e aumentaram a busca e a exploração do alimento, quando comparado aos animais NO.

**Tabela 3.** Ingestão de alimento, água e comportamentos ingestivos de animais alimentados livremente. Comparação entre os animais submetidos a injeções de Metergolina, 8-OH ou veículo no ARC, LH ou em AHA.

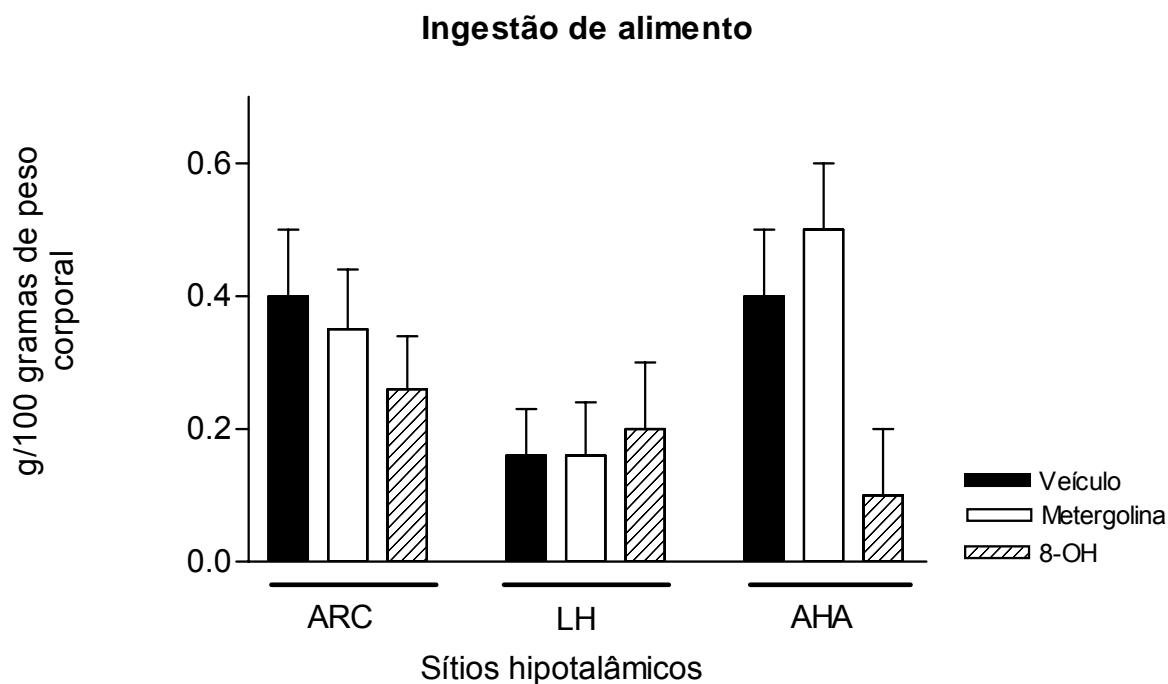
	ARC			LH			AHA		
	Metergolina (n=16)	8-OH (n=16)	Veículo (n=16)	Metergolina (n=10)	8-OH (n=10)	Veículo (n=10)	Metergolina (n=5)	8-OH (n=5)	Veículo (n=5)
<b>Ingestão de alimento (g)</b>	0,35 ± 0,1	0,26 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,16 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,16 ± 0,07	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1
<b>Ingestão de água (g)</b>	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,27 ± 0,14	0,01 ± 0,01	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,05 ± 0,02	0,1 ± 0,04
<b>COMER</b>									
<b>Duração (s)</b>	202,0 ± 54,5	132,2 ± 44,1	227,1 ± 65,0	103,7 ± 55,7	101,5 ± 54,0	65,8 ± 31,4	292,7 ± 93,2	57,4 ± 57,4	307,8 ± 131,3
<b>Latência (s)</b>	974,0 ± 180,5	1160,0 ± 179,0	1080,9 ± 182,9	1258,8 ± 233,1	1477,8 ± 171,7	1126,0 ± 246,4	1025,0 ± 346,1	1511,8 ± 288,2	885,8 ± 264,1
<b>Frequência (e)</b>	3,3 ± 0,8	2,6 ± 0,9	2,9 ± 0,9	2,0 ± 1,2	1,0 ± 0,5	1,8 ± 0,8	2,2 ± 0,5	1,0 ± 1,0	4,2 ± 1,3
<b>BEBER</b>									
<b>Duração (s)</b>	20,8 ± 8,7	11,9 ± 8,0	35,4 ± 16,1	5,7 ± 5,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	16,2 ± 16,2	16,8 ± 12,4	19,2 ± 12,0
<b>Latência (s)</b>	1225,8 ± 196,5	1421,4 ± 162,5	1354,5 ± 179,8	1641,1 ± 158,9	1800 ± 0,0	1800,0 ± 0,0	1430,7 ± 369,2	1257,0 ± 340,3	1208,6 ± 328,3
<b>Frequência (e)</b>	1,7 ± 0,8	1,8 ± 1,2	1,3 ± 0,5	0,5 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,2 ± 1,2	0,8 ± 0,6	2,2 ± 1,5
<b>EXP. ALIMENTO</b>									
<b>Duração (s)</b>	63,0 ± 13,7	85,0 ± 16,5	63,0 ± 13,4	78,6 ± 26,0	47,3 ± 15,8	61,4 ± 19,7	54,2 ± 15,1	53,8 ± 21,8	80,0 ± 15,8
<b>Latência (s)</b>	337,3 ± 155,3	252,2 ± 151,2	129,0 ± 48,2	566,8 ± 222,9	654,4 ± 222,8	600,7 ± 239,9	4,7 ± 2,4	383,8 ± 354,2	32,8 ± 21,2
<b>Frequência (e)</b>	8,2 ± 1,3	11,7 ± 2,0	10,0 ± 1,8	7,2 ± 2,6	4,4 ± 1,4	5,4 ± 1,3	10,5 ± 1,7	9,2 ± 3,6	14,4 ± 2,1

Todos os dados estão representados em média ± erro padrão da média. (g) gramas; (s) segundos; (e) nº. de eventos. (\*) p<0,05 (ANOVA) em relação ao veículo.

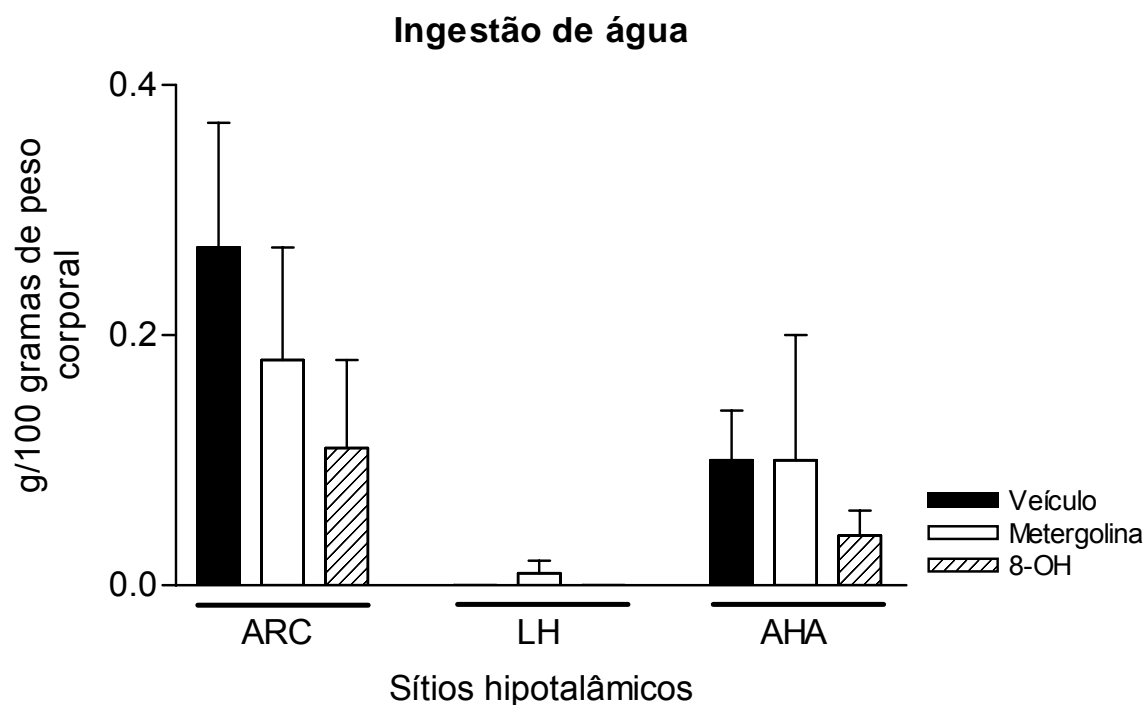
**Tabela 4.** Comportamentos não – ingestivos de animais alimentados livremente. Comparação entre os animais submetidos a injeções de Metergolina, 8-OH ou veículo no ARC, LH ou em AHA

EXP. AMBIENTE	ARC			LH			AHA		
	Metergolina (n=16)	8-OH (n=16)	Veículo (n=16)	Metergolina (n=10)	8-OH (n=10)	Veículo (n=8)	Metergolina (n=4)	8-OH (n=5)	Veículo (n=5)
<b>Duração (s)</b>	653,9 ± 66,7	892,3 ± 89,7	638,2 ± 67,9	736,1 ± 100,7	861,6 ± 110,3	856,7 ± 126,6	502,0 ± 159,6	715,6 ± 127,6	539,8 ± 66,1
<b>Latência (s)</b>	2,9 ± 2,7	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,6	8,2 ± 6,4	14,3 ± 13,5	2,7 ± 2,7	0,0 ± 0,0	3,0 ± 3,0	0,0 ± 0,0
<b>Frequência (e)</b>	42,8 ± 3,8	45,9 ± 4,2	45,3 ± 4,6	35,5 ± 3,1	43,7 ± 8,1	45,6 ± 7,7	38,2 ± 4,7	51,4 ± 8,4	44,0 ± 5,6
<b>EXP. VERTICAL</b>									
<b>Duração (s)</b>	77,2 ± 16,6	82,0 ± 31,0	83,6 ± 18,9	105,0 ± 20,5	118,7 ± 41,7	117,2 ± 37,4	47,7 ± 33,8	98,6 ± 49,0	72,8 ± 35,1
<b>Latência (s)</b>	51,9 ± 15,5	1641,1 ± 112,2	34,0 ± 10,5	170,1 ± 58,2	171,7 ± 125,2	270,0 ± 219,2	213,5 ± 111,7	65,0 ± 37,4	49,0 ± 24,9
<b>Frequência (e)</b>	17,5 ± 2,9	20,2 ± 4,2	20,4 ± 4,1	16,3 ± 2,6	27,2 ± 7,4	24,5 ± 5,5	13,5 ± 5,6	18,8 ± 5,8	16,4 ± 5,7
<b>LOCOMOÇÃO</b>									
<b>Duração (s)</b>	2,8 ± 0,8	2,7 ± 1,1	4,1 ± 2,0	1,1 ± 0,7	1,4 ± 0,6	2,5 ± 0,8	2,5 ± 1,9	0,4 ± 0,2	4,4 ± 2,4
<b>Latência (s)</b>	806,5 ± 190,5	941,4 ± 210,2	1135,2 ± 194,2	1271,5 ± 232,5	1196,7 ± 256,3	708,9 ± 262,3	1006,7 ± 462,8	1417,8 ± 270,8 <sup>a</sup>	299,6 ± 247,1
<b>Frequência (e)</b>	2,7 ± 0,7	2,4 ± 1,0	3,2 ± 1,4	1,0 ± 0,6	1,2 ± 0,4	2,1 ± 0,7	2,5 ± 1,9	0,4 ± 0,2	3,4 ± 1,5
<b>IMOBILIDADE</b>									
<b>Duração (s)</b>	422,4 ± 104,5	344,6 ± 124,1	373,6 ± 114,1	519,1 ± 158,1	461,7 ± 182,5	430,5 ± 194,9	488,5 ± 134,4	154,8 ± 88,2	395,8 ± 224,8
<b>Latência (s)</b>	495,7 ± 121,0	854,9 ± 185,2	656,7 ± 169,5	494,4 ± 170,7	626,3 ± 235,6	316,0 ± 125,7	434,0 ± 223,3	627,2 ± 313,3	801,6 ± 302,2
<b>Frequência (e)</b>	7,0 ± 1,3	5,3 ± 1,6	656,7 ± 169,5	6,2 ± 1,3	5,8 ± 1,9	7,1 ± 1,6	7,7 ± 3,4	4,6 ± 1,9	4,6 ± 2,2
<b>MANUTENÇÃO</b>									
<b>Duração (s)</b>	356,5 ± 69,5	252,2 ± 39,5	374,8 ± 49,3	212,7 ± 46,9	205,3 ± 45,7	247,0 ± 33,5	333,0 ± 84,3	699,4 ± 141,2 <sup>a</sup>	385,8 ± 57,0
<b>Latência (s)</b>	179,4 ± 36,2	270,0 ± 87,6	111,6 ± 16,2	110,9 ± 14,3	268,1 ± 98,9	262,4 ± 112,4	181,2 ± 57,9	106,4 ± 33,0	132,8 ± 40,8
<b>Frequência (e)</b>	17,4 ± 3,7	13,0 ± 1,6	16,2 ± 2,0	12,2 ± 2,3	10,2 ± 2,2	15,0 ± 3,1	15,5 ± 4,7	23,8 ± 5,1	15,4 ± 3,3

Todos os dados estão representados em média ± erro padrão da média. (s) segundos; (e) n°. de eventos. (\*) p < 0,05 (ANOVA) em relação ao veículo.



**Figura 4.** Ingestão de alimentos de animais alimentados livremente, submetidos as injeções de Metergolina, 8-OH ou veículo, no ARC, LH ou em AHA.



**Figura 5.** Ingestão de água de animais alimentados livremente, submetidos as injeções de Metergolina, 8-OH ou veículo, no ARC, LH ou em AHA.



### **3. Observações comportamentais em animais não-operados (NO) RA.**

Foi utilizado um total de 45 ratos, submetidos ao mesmo protocolo experimental, de forma idêntica aos animais operados e tratados.

A análise comportamental mostrou que esses animais, durante o período (30 minutos) observado, apresentaram comportamentos exploratórios por volta de 30% do tempo, e comportamentos ingestivos por mais da metade do tempo total. Além disso, esses animais apresentaram uma latência muito baixa ( $131,3 \pm 22,0$  segundos) para iniciar os comportamentos ingestivos, sendo observados o consumo de alimento, logo nos primeiros minutos de observação.

Quanto à quantidade de alimento e água ingeridos, em média, esses animais comem  $1,9 \pm 0,08$  g de ração por 100 g de peso corpóreo em 30 minutos, chegando a consumir  $3,7 \pm 0,1$  g ao final de 2 horas, e bebem  $0,4 \pm 0,1$  g de água por 100 g de peso corpóreo em 30 minutos, chegando a  $3,3 \pm 0,2$  g em 2 horas (tab. 5).

#### **4. Efeitos ingestivos e comportamentais da microinjeção local de Met, 8-OH ou Veículo no ARC, LH ou em AHA de ratos RA.**

Do total de 54 ratos canulados RA, 16 animais receberam injeções no ARC, 10 animais receberam injeções no LH e 28 animais receberam injeções em AHA (Fig.2 e 3).

De forma semelhante aos animais AL, as manipulações incluindo a implantação da cânula-guia e a administração de veículo em todas as áreas hipotalâmicas estudadas, de animais em regime de restrição, não alterou a ingestão de água ou de alimentos, mas foi capaz de aumentar significativamente a frequência da manutenção (auto-limpeza) [ARC:  $F(1,41)=7,0$ ;  $p=0,01$ ; LH:  $F(1,33)=8,4$ ;  $p=0,006$ ; AHA:  $F(1,53)=4,7$ ;  $p=0,03$ ], em relação aos animais NO (Tab. 6).

Dentre as diversas áreas hipotalâmicas que administramos veículo, o LH parece ser a mais sensível a essa manipulação. Injeções nesta área aumentaram significativamente a frequência para comer [ $F(1,33)=16,8$ ;  $p=0,0002$ ] e para beber [ $F(1,33)=18,3$ ;  $p=0,0001$ ], e diminuíram a latência para iniciar esses comportamentos [ $F(1,33)=5,9$ ;  $p=0,01$ ;  $F(1,33)=19,5$ ;  $p=0,00009$ , respectivamente], além de aumentarem a duração [ $F(1,33)=6,2$ ;  $p=0,01$ ] e a frequência [ $F(1,33)=19,1$ ;  $p=0,0001$ ] de exploração do

alimento, sem alterar as quantidades de água e alimento ingeridos (Tab. 5). Nesses animais, ainda foram observados um aumento significativo na atividade locomotora (duração/freqüência) [ $F(1,33)=4,1$ ;  $p=0,04$ ;  $F(1,33)=15,0$ ;  $p=0,0004$ , respectivamente] com queda na latência para iniciar a locomoção [ $F(1,33)=7,3$ ;  $p=0,01$ ], e um aumento na latência para começar a explorar o ambiente [ $F(1,33)=5,2$ ;  $p=0,02$ ] (Tab. 6).

Foram observadas, alterações significativas na atividade exploratória de animais que receberam injeções de veículo em AHA. Houve diminuição na duração da exploração do ambiente [ $F(1,53)=4,5$ ;  $p=0,03$ ] e na duração e freqüência da exploração vertical (rearing) [ $F(1,53)=8,0$ ;  $p=0,006$ ;  $F(1,53)=8,8$ ;  $p=0,004$ , respectivamente], quando comparado aos animais NO (Tab. 6).

Microinjeções de Met no ARC ou em AHA de animais RA não provocaram alterações comportamentais ou ingestivas, quando comparado às microinjeções de veículo nesses sítios (Tab. 7 e 8; Fig. 6 e 7). No entanto, a administração de Met no LH diminuiu significativamente a duração da exploração do alimento [ $F(2,138)=0,3$ ;  $p=0,02$ ] e aumentou a duração da imobilidade [ $F(2,138)=4,3$ ;  $p=0,004$ ] e a latência para iniciar a locomoção [ $F(2,138)=0,9$ ;  $p=0,03$ ], em relação às injeções de veículo (Tab. 7 e 8).

**Tabela 5.** Ingestão de alimento, água e comportamentos ingestivos de animais submetidos à restrição alimentar. Comparação entre animais não-operados (NO) e animais submetidos a injeções de veículo no ARC, LH ou em AHA.

	NO	Veículo - ARC (n=16)	Veículo - LH (n=10)	Veículo - AHA (n=28)
<b>Ingestão de alimento (g)</b>	1,9 ± 0,08 (45)	1,8 ± 0,1	2,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1
<b>Ingestão de água (g)</b>	0,4 ± 0,1 (33)	0,7 ± 0,25	0,45 ± 0,2	0,9 ± 0,2
<b>COMER</b>				
<b>Duração (s)</b>	1017,2 ± 74,7 (27)	873,4 ± 102,7	1122,1 ± 65,7	1055,0 ± 67,4
<b>Latência (s)</b>	131,3 ± 22,0 (27)	242,2 ± 107,9	30,4 ± 9,7 *	135,7 ± 63,5
<b>Frequência (e)</b>	9,7 ± 0,8 (27)	9,6 ± 1,3	18,1 ± 2,5 *	11,9 ± 1,1
<b>BEBER</b>				
<b>Duração (s)</b>	40,6 ± 11,7 (27)	61,3 ± 18,7	72,1 ± 38,8	78,9 ± 18,4
<b>Latência (s)</b>	1414,6 ± 100,3 (27)	1049,7 ± 185,8	516,0 ± 154,0 *	1123,9 ± 108,3
<b>Frequência (e)</b>	1,1 ± 0,3 (27)	1,5 ± 0,4	4,4 ± 0,9 *	2,5 ± 0,5
<b>EXP. ALIMENTO</b>				
<b>Duração (s)</b>	150,6 ± 18,5 (27)	137,0 ± 13,6	241,5 ± 21,6 *	149,7 ± 16,1
<b>Latência (s)</b>	52,7 ± 15,3 (27)	20,8 ± 4,1	14,0 ± 9,0	85,9 ± 63,8
<b>Frequência (e)</b>	14,5 ± 1,0 (27)	16,1 ± 1,3	25,4 ± 2,9 *	17,6 ± 1,6

Todos os dados estão representados em média ± erro padrão da média. (g) gramas; (s) segundos; (e) nº. de eventos. (\*) p < 0,05 (ANOVA) em relação aos NO.

**Tabela 6.** Comportamentos não – ingestivos de animais submetidos à restrição alimentar. Comparação entre animais não-operados (NO) e animais submetidos a injeções de veículo no ARC, LH ou em AHA

	NO (n=27)	Veículo - ARC (n=16)	Veículo - LH (n=8)	Veículo - AHA (n=28)
<b>EXP. AMBIENTE</b>				
Duração (s)	391,5 ± 58,8	367,0 ± 51,1	183,5 ± 54,9	249,4 ± 32,9 <sup>*</sup>
Latência (s)	7,6 ± 2,3	8,2 ± 3,8	89,6 ± 67,5 <sup>*</sup>	77,5 ± 39,5
Frequência (e)	28,0 ± 3,2	31,7 ± 3,6	28,9 ± 5,3	25,0 ± 2,6
<b>EXP. VERTICAL</b>				
Duração (s)	72,1 ± 13,4	58,3 ± 19,1	71,6 ± 20,9	31,4 ± 5,6 <sup>*</sup>
Latência (s)	308,1 ± 95,6	146,2 ± 54,7	697,9 ± 229,2	432,8 ± 100,1
Frequência (e)	15,9 ± 2,4	13,7 ± 3,0	15,2 ± 4,5	8,1 ± 1,0 <sup>*</sup>
<b>LOCOMOÇÃO</b>				
Duração (s)	18,7 ± 5,4	10,6 ± 3,4	41,0 ± 8,1 <sup>*</sup>	14,2 ± 3,1
Latência (s)	854,0 ± 160,7	408,0 ± 145,3	43,7 ± 20,2 <sup>*</sup>	771,4 ± 140,6
Frequência (e)	5,5 ± 1,4	6,0 ± 1,6	18,1 ± 3,4 <sup>*</sup>	6,2 ± 1,1
<b>IMOBILIDADE</b>				
Duração (s)	23,3 ± 10,8	43,2 ± 20,4	8,4 ± 5,6	79,4 ± 41,2
Latência (s)	1476,4 ± 123,6	1215,5 ± 172,4	1014,4 ± 315,2	1297,2 ± 140,1
Frequência (e)	0,9 ± 0,4	1,7 ± 0,7	0,5 ± 0,2	2,5 ± 0,9
<b>MANUTENÇÃO</b>				
Duração (s)	64,3 ± 20,1	211,8 ± 75,3 <sup>*</sup>	59,4 ± 18,7	116,0 ± 32,5
Latência (s)	590,9 ± 103,7	487,1 ± 101,2	746,2 ± 196,9	587,4 ± 107,2
Frequência (e)	4,3 ± 0,8	8,5 ± 1,5 <sup>*</sup>	10,1 ± 2,4 <sup>*</sup>	7,9 ± 1,4 <sup>*</sup>

Todos os dados estão representados em média ± erro padrão da média. (s) segundos; (e) nº. de eventos. (<sup>\*</sup>) p<0,05 (ANOVA) em relação aos NO.

De maneira semelhante à Met, microinjeções de 8-OH não foram eficazes em provocar alterações comportamentais ou ingestivas, quando administradas no ARC ou em AHA, em relação às injeções de veículo (Tab. 7 e 8; Fig. 6 e 7). Porém, microinjeções de 8-OH, no LH de animais RA, diminuíram a duração e frequência da exploração vertical [ $F(2,138)=2,8$ ;  $p=0,01$ ;  $F(2,138)=4,0$ ;  $p=0,01$ ; respectivamente] e a frequência da exploração do ambiente [ $F(2,138)=7,4$ ;  $p=0,03$ ], quando comparado às injeções de veículo (Tab. 8).

Em resumo, injeções de Met e 8-OH no ARC, LH ou em AHA de animais RA, não modificam o consumo de água ou alimento, porém, injeções de metergolina no LH aumentaram a imobilidade e a latência para iniciar a locomoção, além de diminuir a exploração do alimento. A administração de 8-OH neste mesmo núcleo diminuiu a atividade exploratória. No entanto, a administração de veículo no ARC, LH ou em AHA já foi capaz de provocar alterações comportamentais. Injeções de veículo em qualquer das áreas estudadas aumentaram a atividade de manutenção (auto-limpeza). Além disso, injeções no LH aumentaram a atividade locomotora e a exploração do alimento, diminuindo a atividade exploratória do ambiente. Esta diminuição da atividade exploratória foi também observada em AHA.

**Tabela 7.** Ingestão de alimento, água e comportamentos ingestivos de animais submetidos à restrição alimentar. Comparação entre os animais submetidos a injeções de Metergolina, 8-OH ou veículo no ARC, LH ou em AHA.

	ARC			LH			AHA		
	Metergolina (n=16)	8-OH (n=14)	Veículo (n=16)	Metergolina (n=8)	8-OH (n=7)	Veículo (n=10)	Metergolina (n=26)	8-OH (n=24)	Veículo (n=28)
Ingestão de alimento (g)	1,28 ± 0,1	1,84 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,2	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Ingestão de água (g)	0,35 ± 0,17	1,0 ± 0,5	0,7 ± 0,25	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,15	0,45 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,2
<b>COMER</b>									
Duração (s)	734,1 ± 58,4	1013,7 ± 117,8	873,4 ± 102,7	833,6 ± 116,5	1149,4 ± 129,1	1122,1 ± 65,7	899,8 ± 73,7	1060,2 ± 70,0	1055,0 ± 67,4
Latência (s)	177,2 ± 40,1	215,4 ± 124,3	242,2 ± 107,9	310,0 ± 182,3	89,1 ± 65,1	30,4 ± 9,7	286,9 ± 86,1	143,5 ± 76,0	135,7 ± 63,5
Frequência (e)	10,9 ± 1,8	10,8 ± 1,7	9,6 ± 1,3	13,7 ± 4,1	18,3 ± 2,8	18,1 ± 2,5	10,9 ± 1,4	13,0 ± 1,5	11,9 ± 1,1
<b>BEBER</b>									
Duração (s)	43,9 ± 16,2	105,5 ± 34,1	61,3 ± 18,7	34,4 ± 16,1	81,6 ± 45,0	72,1 ± 38,8	36,2 ± 12,8	59,7 ± 17,4	78,9 ± 18,4
Latência (s)	1269,7 ± 166,6	1160,2 ± 173,3	1049,7 ± 185,8	971,2 ± 259,3	1002,8 ± 252,1	516,0 ± 154,0	1198,9 ± 125,6	1278,6 ± 121,7	1123,9 ± 108,3
Frequência (e)	1,2 ± 0,53	2,0 ± 0,7	1,5 ± 0,4	3,2 ± 1,4	3,7 ± 1,0	4,4 ± 0,9	2,4 ± 0,7	2,3 ± 0,6	2,5 ± 0,5
<b>EXP. ALIMENTO</b>									
Duração (s)	172,8 ± 18,1	136,7 ± 20,9	137,0 ± 13,6	165,0 ± 32,7 *	251,8 ± 25,6	241,5 ± 21,6	160,1 ± 18,8	153,6 ± 16,1	149,7 ± 16,1
Latência (s)	47,3 ± 16,0	105,7 ± 68,3	20,8 ± 4,1	221,0 ± 166,8	7,1 ± 6,6	14,0 ± 9,0	106,6 ± 49,1	38,5 ± 22,6	85,9 ± 63,8
Frequência (e)	20,6 ± 2,4	17,0 ± 2,1	16,1 ± 1,3	20,1 ± 5,0	28,4 ± 2,6	25,4 ± 2,9	19,4 ± 1,9	19,0 ± 1,7	17,6 ± 1,6

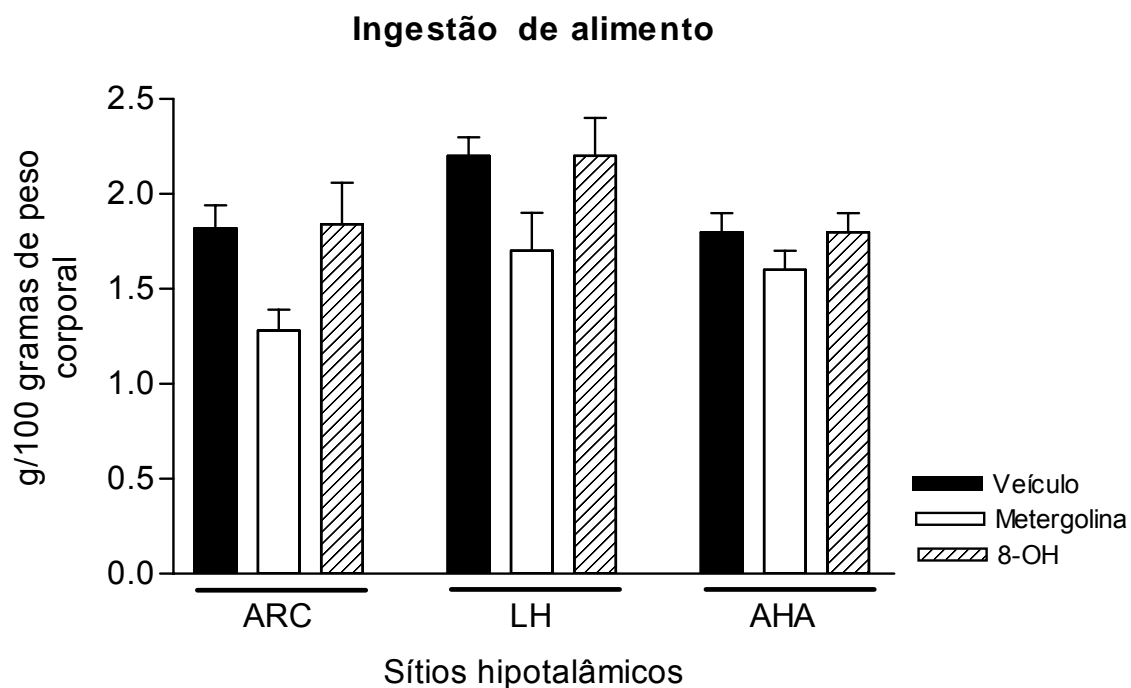
Todos os dados estão representados em média ± erro padrão da média. (g) gramas; (s) segundos; (e) nº de eventos. (\*) p < 0,05 (ANOVA) em relação ao veículo.

**Tabela 8.** Comportamentos não – ingestivos de animais submetidos à restrição alimentar. Comparação entre os animais submetidos a injeções de Metergolina, 8-OH ou veículo no ARC, LH ou em AHA.

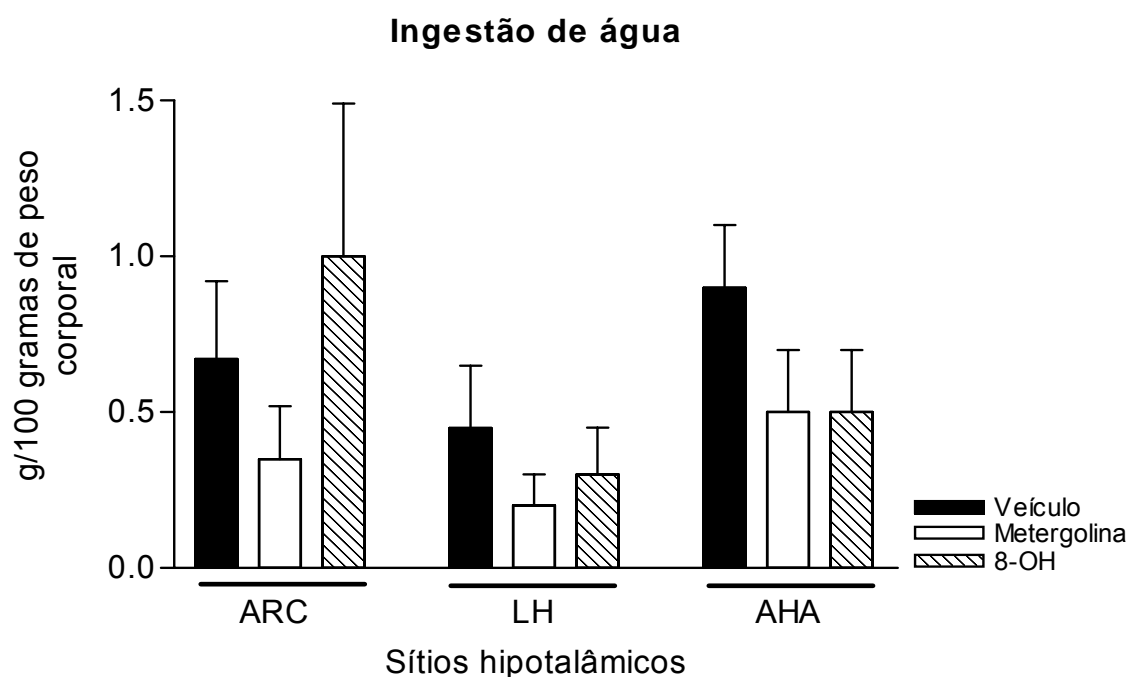
	ARC			LH			AHA		
	Metergolina (n=16)	8-OH (n=14)	Veículo (n=16)	Metergolina (n=8)	8-OH (n=7)	Veículo (n=8)	Metergolina (n=26)	8-OH (n=24)	Veículo (n=28)
<b>EXP. AMBIENTE</b>									
Duração (s)	508,2 ± 49,2	353,7 ± 72,9	367,0 ± 51,1	198,1 ± 48,0	97,7 ± 14,4	183,5 ± 54,9	360,2 ± 41,9	269,5 ± 32,5	249,4 ± 32,9
Latência (s)	4,6 ± 1,8	8,7 ± 4,1	8,2 ± 3,8	97,2 ± 52,2	99,4 ± 65,2	89,6 ± 67,5	50,8 ± 41,1	48,5 ± 29,8	77,5 ± 39,5
Frequência (e)	43,2 ± 3,8	31,7 ± 4,9	31,7 ± 3,6	31,7 ± 6,8	15,7 ± 2,2*	28,9 ± 5,3	36,7 ± 3,1	26,4 ± 2,0	25,0 ± 2,6
<b>EXP. VERTICAL</b>									
Duração (s)	87,9 ± 14,9	43,9 ± 10,7	58,3 ± 19,1	36,1 ± 13,4	21,7 ± 8,1*	71,6 ± 20,9	40,8 ± 7,5	31,1 ± 7,1	31,4 ± 5,6
Latência (s)	135,7 ± 42,7	231,8 ± 127,5	146,2 ± 54,7	434,1 ± 205,9	675,4 ± 167,4	697,9 ± 229,2	321,6 ± 97,7	744,0 ± 105,8	432,8 ± 100,1
Frequência (e)	19,6 ± 2,8	12,4 ± 2,2	13,7 ± 3,0	11,3 ± 4,7	5,1 ± 0,9*	15,2 ± 4,5	11,4 ± 1,6	7,8 ± 1,1	8,1 ± 1,0
<b>LOCOMOÇÃO</b>									
Duração (s)	11,8 ± 4,1	9,8 ± 3,0	10,6 ± 3,4	33,4 ± 10,8	31,0 ± 8,5	41,0 ± 8,1	23,6 ± 6,0	19,6 ± 5,3	14,2 ± 3,1
Latência (s)	557,1 ± 153,7	581,8 ± 191,0	408,0 ± 145,3	652,0 ± 256,2*	217,6 ± 111,9	43,7 ± 20,2	574,1 ± 132,6	848,0 ± 138,2	771,4 ± 140,6
Frequência (e)	6,8 ± 1,9	4,6 ± 1,3	6,0 ± 1,6	12,2 ± 3,7	11,8 ± 2,6	18,1 ± 3,4	10,2 ± 2,2	8,3 ± 1,9	6,2 ± 1,1
<b>IMOBILIDADE</b>									
Duração (s)	75,9 ± 24,4	45,0 ± 35,7	43,2 ± 20,4	306,4 ± 150,2*	19,8 ± 14,3	8,4 ± 5,6	163,2 ± 75,5	89,6 ± 38,5	79,4 ± 41,2
Latência (s)	826,4 ± 204,5	1241,1 ± 222,0	1215,5 ± 172,4	1084,5 ± 267,9	1380,6 ± 279,3	1014,4 ± 315,2	946,7 ± 157,6	1240,0 ± 152,6	1297,2 ± 140,1
Frequência (e)	3,4 ± 1,4	2,9 ± 1,9	1,7 ± 0,7	4,7 ± 1,8	0,85 ± 0,7	0,5 ± 0,2	3,7 ± 1,1	2,3 ± 0,8	2,5 ± 0,9
<b>MANUTENÇÃO</b>									
Duração (s)	124,9 ± 24,4	90,3 ± 38,7	211,8 ± 75,3	142,7 ± 78,6	146,7 ± 105,6	59,4 ± 18,7	126,4 ± 28,3	101,4 ± 23,6	116,0 ± 32,5
Latência (s)	410,8 ± 89,8	542,1 ± 138,9	487,1 ± 101,2	711,5 ± 241,5	659,3 ± 177,6	746,2 ± 196,9	556,6 ± 103,4	689,4 ± 108,1	587,4 ± 107,2
Frequência (e)	6,6 ± 0,8	7,1 ± 1,7	8,5 ± 1,5	7,6 ± 2,7	7,6 ± 2,8	10,1 ± 2,4	9,7 ± 1,9	6,1 ± 1,2	7,9 ± 1,4

Todos os dados estão representados em média ± erro padrão da média. (s) segundos; (e) nº. de eventos. (\*) p<0,05 (ANOVA) em relação ao veículo.





**Figura 6.** Ingestão de alimentos de animais em regime de restrição alimentar, submetidos a injeções de Metergolina, 8-OH ou veículo, no ARC, LH ou em AHA.



**Figura 7.** Ingestão de água de animais em regime de restrição alimentar, submetidos a injeções de Metergolina, 8-OH ou veículo, no ARC, LH ou em AHA.

## DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho mostraram que injeções de 20 nmol de Met no ARC ou no LH de ratos machos submetidos a dois regimes de alimentação, animais alimentados livremente (AL) ou restritos de alimento (RA), não afetaram a ingestão de alimentos, nem a ingestão de água.

No entanto, sabe-se que um aumento na atividade de circuitos centrais que liberam 5-HT inibe a ingestão de alimentos (Blundell, 1986; Simansky, 1996; Weltzin *et al.*, 1994). Estudos anteriores, nos quais a administração do antagonista Met foi efetuada tanto centralmente como periféricamente, sugeriram que a 5-HT exerce um papel inibitório tônico sobre a ingestão alimentar. A administração sistêmica de Met em ratos machos AL ou saciados, causou aumento no consumo de alimentos (Fletcher *et al.*, 1988; Dourish *et al.*, 1989; Stallone *et al.*, 1989a; Currie *et al.*, 1996), enquanto que em ratos restritos de alimento, a Met inibiu o efeito hipofágico causado por agonistas 5-HT<sub>1B</sub> (Bendotti *et al.*, 1987) ou pela d-fenfluramina (Samanin *et al.*, 1989).

Esses dados sugerem não apenas uma ação tônica inibitória pela circuitaria serotoninérgica no controle da ingestão alimentar, mas também, a participação de receptores 5-HT<sub>1/2</sub> na modulação desses sinais. Entretanto, esses estudos não

esclareceram em quais regiões no SNC, principalmente hipotalâmicas, que residem esses circuitos serotoninérgicos que inibem a ingestão de alimentos.

Com o propósito de esclarecer os locais centrais onde agem os receptores 5-HT<sub>1/2</sub> no controle da ingestão, administrações centrais (i.c.v), no 3º ventrículo e no ventrículo lateral, de Met foram realizadas em ratos saciados ou AL (Coscina *et al.*, 1994). Essas injeções causaram efeitos hiperfágicos sem alterar a ingestão de água. Em experimentos nos quais foram administrados Met e, em seguida 5-HT diretamente no PVN, a Met inibiu a ação hipofágica da 5-HT (Weiss *et al.*, 1986; Leibowitz *et al.*, 1993), porém, quando administrada sozinha no PVN, em doses de 20 nmol por exemplo, foi ineficaz em alterar a ingestão alimentar (Coscina *et al.*, 1994; Currie *et al.*, 1996). Por outro lado, estudos têm apontado áreas extra-hipotalâmicas envolvidas na rede de circuitos serotoninérgicos que controlam a ingestão. Experimentos como o de Parker e cols. (2001b), no qual foram feitas injeções bilaterais de Met na amígdala posterodorsal de ratas AL, indicaram aumento na ingestão de alimentos, sugerindo a presença da atividade tônica inibitória nesta área.

Sendo assim, considerando os dados mencionados anteriormente, e nossos resultados que indicaram que o bloqueio de receptores 5-HT<sub>1/2</sub> em outros sítios hipotalâmicos importantes

no controle da ingestão alimentar, como o ARC e o LH, não alteram o consumo de alimentos, podemos propor que a atividade tônica inibitória que a 5-HT exerce em circuitos localizados no hipotálamo não resida em núcleos como, PVN, ARC e LH de ratos AL ou RA.

Outros dados apresentados no presente trabalho e que reforçam a idéia proposta acima, são os resultados das injeções de 8-OH no ARC e no LH de ratos. A administração de 8-OH no ARC e no LH de ratos machos AL ou RA não afetou a ingestão de água ou alimento. Entretanto, inúmeros trabalhos têm demonstrado a participação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> em circuitos serotoninérgicos que inibem tonicamente a ingestão de alimentos. Por exemplo, injeções sistêmicas de 30 µg/Kg e 60 µg/Kg de 8-OH foram efetivas em suprimir a ação anoréxica causada por administrações, também sistêmicas, de d-fenfluramina (Dourish *et al.*, 1988) e de CCK (Poeschla *et al.*, 1992).

Além disso, administrações sistêmicas de 8-OH nas menores doses (15 – 60 µg/Kg), em animais alimentados livremente, aumentam a ingestão de alimentos (Dourish *et al.*, 1985a,b, 1986a,b, 1988; Bendotti *et al.*, 1986, 1987; Hutson *et al.*, 1986a, 1988b; Fletcher *et al.*, 1990a; Ebenezer *et al.*, 1992a), enquanto que em animais em jejum, nas maiores doses (250 – 4000 µg/Kg), diminuem a ingestão de alimentos, além de alterar a

atividade locomotora e induzir o animal a uma série de comportamentos estereotipados. Essas alterações comportamentais e locomotoras não parecem ser efeitos secundários aos efeitos ingestivos (Bendotti *et al.*, 1987; Ebenezer *et al.*, 1992b). Estes resultados opostos em diferentes doses sugerem uma ação de diferentes tipos de receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Doses menores atuam principalmente em receptores pré-sinápticos inibindo a liberação de 5-HT e, portanto, antagonizando seu efeito, enquanto que, doses maiores são mais efetivas em estimular receptores pós-sinápticos, reproduzindo a ação da 5-HT (Dourish *et al.*, 1985a; 1986b; Hutson *et al.*, 1986a).

O efeito hiperfágico da administração sistêmica de 8-OH, visto em ratos AL e o efeito hipofágico, visto em ratos em jejum, foram também observados em outras espécies de mamíferos e em espécies de aves. Trabalhos utilizando porcos (Ebenezer *et al.*, 1999) e galinhas (Cabrera e Saadoun, 2001), por exemplo, observaram estes efeitos, enquanto que, em nosso laboratório, experimentos (em andamento) com pombos alimentados livremente têm mostrado um efeito hipofágico na administração sistêmica de 8-OH. Isto indica uma participação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> no controle da ingestão alimentar em diferentes espécies de animais, sugerindo que a função desses receptores em circuitos serotoninérgicos que modulam o consumo de alimentos é um atributo

fisiológico parcialmente preservado através da filogênese de vertebrados.

Outros estudos buscaram descrever os efeitos das injeções sistêmicas de 8-OH sobre a liberação de 5-HT em diversas áreas do SNC. Em doses que causavam o efeito paradoxal visto na ingestão de animais submetidos a diferentes dietas, citados acima, e utilizando métodos de microdiálise, injeções de 8-OH em ratos reduziram a 5-HT extracelular no hipocampo (Hjorth e Sharp, 1991; Adell *et al.*, 1993; Casanovas *et al.*, 1997), córtex frontal e núcleo accumbens (Hjorth e Sharp, 1991) e núcleos da rafe (Adell *et al.*, 1993). Esta queda nos níveis de 5-HT após administrações de 8-OH tem sido observada também no hipotálamo (Hutson *et al.*, 1986b). No LH, um dos principais destinos para as aferências serotoninérgicas que partem da rafe (Vertes *et al.*, 1988), injeções sistêmicas de 8-OH reduziram os níveis de 5-HT extracelular em ratos AL, porém, em ratos submetidos a jejum, não foram observadas diferenças (Voigt *et al.*, 2000). Sabe-se que em ratos submetidos ao jejum, ocorre um aumento da 5-HT no LH (Kantak *et al.*, 1978; Loullis *et al.*, 1979; Fuenmayor *et al.*, 1984), sugerindo portanto, um processo compensatório resultando em nenhuma mudança nos níveis extracelulares de 5-HT após a administração de 8-OH.

No SNC, sabe-se que a administração de 8-OH, na dose de 1,6 nmol, nos núcleos da rafe de ratos AL aumentam a ingestão de alimentos (Bendotti *et al.*, 1986; Hutson *et al.*, 1986a; Fletcher *et al.*, 1990a,b, 1991a,b, 1993; Currie *et al.*, 1993, 1994b). No entanto, lesões bilaterais na amígdala posterodorsal de ratas alimentadas livremente, suprimiram tanto a ingestão de alimentos induzida por 1,6 nmol de 8-OH administrado na rafe (Coscina *et al.*, 2000), como também a ingestão induzida por injeções sistêmicas de 8-OH (Parker *et al.*, 2001a). Isso reforça a hipótese de que o complexo amigdalóide participe na modulação do controle da ingestão alimentar através de circuitos serotoninérgicos. Outros trabalhos indicam também áreas como, núcleos caudado/putâmen e núcleo accumbens, como sendo áreas envolvidas no controle da ingestão de alimentos, através da interação entre sistema dopaminérgico e sistema serotoninérgico. Em experimentos realizados nestes núcleos extra-hipotalâmicos, o bloqueio de receptores opióides e dopaminérgicos demonstrou afetar a ingestão induzida por 8-OH na rafe (Fletcher *et al.*, 1990b; 1991a, b).

Contudo, todos esses dados sugerem a existência de uma ação tônica inibitória por parte da 5-HT e a participação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> na circuitaria serotoninérgica que participa do controle da ingestão alimentar em ratos. Além disso, sugerem também que o 8-OH atue nesses circuitos agindo principalmente

em receptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos. A ativação destes receptores leva a uma redução do efluxo da 5-HT e, conseqüentemente, a uma inibição da atividade de disparo desses neurônios. Se isso é verdade, então tal inibição destes circuitos no ARC ou no LH de ratos AL ou RA não desencadeiam ingestão de alimentos. Podemos sugerir também, uma ausência da ação tônica inibitória por parte da 5-HT em neurônios do ARC e do LH, já que, a ativação ou o bloqueio de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, através de injeções de 8-OH ou Met, nestes sítios hipotalâmicos, não afetam a ingestão de alimentos.

Uma outra questão que poderia por em dúvida nossos dados, é quanto às doses das drogas utilizadas no presente trabalho. Foram testadas doses de 1,6 e 20 nmol de 8-OH e Met, respectivamente. No entanto, sabe-se que injeções de 0,8 e 1,6 nmol de 8-OH no núcleo medial ou dorsal da rafe afetam a ingestão de alimentos em ratos, através da ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos (Currie *et al.*, 1993; Coscina *et al.*, 2000). Além disso, estudos nos quais foram realizadas injeções de Met no PVN de ratos indicaram que doses de 20 e 30 nmol já são capazes de reverter completamente o efeito hipofágico causado por injeções de 10 nmol de 5-HT no mesmo núcleo (Coscina *et al.*, 1994; Currie *et al.*, 1996). Doses de 30 nmol, também foram eficazes em aumentar a ingestão, quando administrado na amígdala posterior de ratas (Parker *et al.*, 2001b). Sendo assim, as



doses administradas neste trabalho demonstraram ser efetivas em áreas do SNC. Porém, nossas doses de 1,6 e 20 nmol de 8-OH e Met, respectivamente, administradas no ARC e no LH de ratos não foram efetivas em induzir respostas ingestivas.

Collin e cols. (2002), através de métodos imunohistoquímicos, identificaram receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos localizados em áreas hipotalâmicas, como os núcleos: supraóptico, PVN, VMH, ARC, e a área PeF do LH. Nestes dois últimos sítios hipotalâmicos, foram identificados também transportadores de 5-HT associados aos receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Além disso, no ARC, os receptores 5-HT<sub>1A</sub> se encontram em neurônios imunoreativos a NPY, AGRP (peptídeos orexigênicos) e a POMC, CART (peptídeos anorexigênicos), enquanto no LH, receptores 5-HT<sub>1A</sub> estão localizados em neurônios imunoreativos a MCH e a orexinas, ambos os peptídeos orexigênicos. Este estudo propõe que os efeitos da 5-HT sobre a ingestão alimentar, através de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos, podem ser mediados por esses peptídeos. Porém, nossos resultados não corroboraram essa idéia, sugerindo que as doses de 8-OH e de Met utilizadas neste trabalho não afetaram a ingestão através de receptores pós-sinápticos.

No entanto, nossos resultados indicaram algumas alterações comportamentais não – ingestivas após a administração de 8-OH e Met no LH de ratos. Injeções de 1,6 nmol de 8-OH no

LH de ratos RA, diminuiu a atividade exploratória, principalmente a exploração vertical nesses animais. Como foi dito anteriormente, altas doses de 8-OH (250 – 4000 µg/Kg) administradas sistemicamente em ratos submetidos a jejum, não só diminui a ingestão de alimentos, como também alteram a atividade locomotora e induzem os animais a um quadro de comportamentos estereotipados denominado de síndrome motora ou síndrome da 5-HT (Bendotti *et al.*, 1987; Ebenezer *et al.*, 1992b). Esse quadro comportamental parece ser mais evidente em animais submetidos a algum tipo de privação alimentar, e tem sido sugerido como sendo um efeito típico da ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos (Dourish *et al.*, 1985a; 1986b; Hutson *et al.*, 1986a). Em trabalhos nos quais foram administrados sistemicamente 500 µg/Kg de 8-OH, foram observados, além do aumento da atividade locomotora e a síndrome motora, uma significativa diminuição da atividade exploratória vertical e da manutenção em ratos (Bendotti *et al.*, 1987; Blanchard *et al.*, 1997) e em camundongos (Kitamura *et al.*, 1996; Bert *et al.*, 2006).

Em contrapartida, as baixas doses sistêmicas de 8-OH (15 – 200 µg/Kg), eficazes em aumentar a ingestão de alimentos de ratos AL, por ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos (Dourish *et al.*, 1985a,b, 1986b, 1988; Bendotti *et al.*, 1986, 1987; Hutson *et al.*, 1986a, 1988b; Fletcher *et al.*, 1991a,b; Ebenezer *et al.*, 1992a), também levam a alterações na atividade locomotora e

exploratória. Doses variando entre 50 e 200  $\mu\text{g/Kg}$  de 8-OH injetadas perifericamente, diminuíram a atividade locomotora e aumentaram a imobilidade, além de reduzir significativamente a exploração vertical e comportamentos de manutenção (Carey *et al.*, 2001, 2002a, 2002b, 2004; De Bôer *et al.*, 2005). Sendo assim, nossos resultados, que mostram uma redução da atividade exploratória, principalmente vertical, após a administração de 8-OH no LH de ratos RA, corroboram esses dados e sugerem a participação de receptores  $5\text{-HT}_{1A}$ , localizados no LH, na modulação desses comportamentos. Porém, não podemos afirmar ao certo, se as alterações da atividade exploratória vistas neste trabalho foram devidas a ações pré ou pós-sinápticas.

Quanto à Met, nossos resultados indicam que injeções de 20 nmol de Met no LH de ratos RA, aumentam a imobilidade e a latência para iniciar a locomoção. No entanto, tem sido demonstrado recentemente por Gooley e cols. (2006), que ratos submetidos à restrição alimentar apresentam um aumento da atividade locomotora, além de aumentar outros comportamentos de vigília. Esse aumento da atividade, observado principalmente no período pré-prandial, é acompanhado por um aumento da atividade de neurônios do DMH, área de grande importância na expressão de ritmos circadianos. Projeções neurais que partem deste núcleo inervam, o núcleo préóptico via neurônios gabaérgicos (inibitórios), e o LH via neurônios glutamatérgicos (excitatórios). Sendo assim,

os autores sugerem que o aumento da atividade de neurônios do DMH causaria uma inibição em neurônios do núcleo préoptico, área envolvida na indução do sono, e uma ativação nos neurônios do LH. Deste núcleo, partem neurônios que contêm orexinas para diversas áreas do SNC, e são esses neurônios, os indicados a aumentar a atividade locomotora e outros comportamentos estereotipados.

Matsuzaki e cols. (2002), descreveram que a administração de orexina-A e orexina-B intracerebroventricular em ratos, induz ao um aumento da atividade locomotora, além de aumentar a duração da manutenção e a expressão de outros comportamentos estereotipados. Além disso, os autores indicam que injeções periféricas de Met revertem o aumento provocado na expressão de certos comportamentos, como a manutenção, por exemplo, sugerindo a participação de receptores serotoninérgicos nas alterações comportamentais induzidas pelas orexinas.

Entretanto, como já foi dito anteriormente, o LH é uma área hipotalâmica rica em neurônios que contêm orexinas, entre outros peptídeos relacionados no controle do apetite (Nambu *et al.*, 1999). Diversos autores observaram um aumento da 5-HT no LH de ratos privados de alimento (Kantak *et al.*, 1978; Loullis *et al.*, 1979; Fuenmayor *et al.*, 1984). Além disso, estudos imunohistoquímicos identificaram receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos em neurônios

imunoreativos a orexinas nesse mesmo núcleo (Collin *et al.*, 2002). Sendo assim, nossos dados corroboram estes achados e sugerem a participação do sistema serotoninérgico, através de receptores 5-HT<sub>1/2</sub> localizados no LH, na modulação dos efeitos comportamentais e locomotores, induzidos por neurônios imunoreativos a orexinas em ratos RA.

Concluindo, os dados do presente trabalho indicam que a ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e o bloqueio de receptores 5-HT<sub>1/2</sub>, no ARC e no LH de ratos, não afetam a ingestão de água e de alimentos em animais AL ou RA. No entanto, sabemos que a 5-HT exerce uma atividade tônica inibitória sobre a ingestão de alimentos, principalmente no processo de saciação. Sabemos também que o bloqueio dessa atividade tônica serotoninérgica aumenta a ingestão em ratos, e isto foi demonstrado em áreas do SNC como, núcleos da rafe e complexo amigdalóide. Porém, no hipotálamo poucos estudos investigaram a presença dessa ação tônica inibitória da 5-HT. Vimos que o bloqueio de receptores 5-HT<sub>1/2</sub> no 3º ventrículo é eficaz em aumentar a ingestão, mas no PVN este bloqueio nada alterou, indicando que neste núcleo não haja atividade tônica serotoninérgica. Portanto, este trabalho sugere que, o ARC e o LH sejam núcleos onde a ação tônica inibitória das 5-HT sobre a ingestão alimentar também esteja ausente. Nossos dados também sugerem a participação de receptores serotoninérgicos, no LH de ratos RA, na modulação de

comportamentos não – ingestivos, como atividade exploratória e locomotora. No entanto, não podemos afirmar ao certo se estes efeitos são devido à ação pré ou pós-sináptica. Para investigar melhor o papel de receptores 5-HT<sub>1/2</sub> em circuitos neurais intra-hipotalâmicos, envolvidos no controle da ingestão, fica evidente a necessidade de mais investigações, explorando outros núcleos relevantes para o controle do consumo de alimentos como, o DMH e o VMH, por exemplo. Uma outra proposta interessante seria investigar o papel de receptores 5-HT<sub>1/2</sub> em animais saciados. Fletcher e cols. (1988) iniciaram esta investigação, através de administrações sistêmicas de antagonistas para receptores 5-HT<sub>1/2</sub>, e verificaram um efeito hiperfágico em animais previamente saciados. No momento, essa investigação em animais previamente saciados já estão sendo realizadas, a partir de administrações centrais de Met ou 8-OH em ratos machos e fêmeas, em nosso laboratório.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELL, A.; CARCELLER, A.; ARTIGAS, F. In vivo brain dialysis study of the somatodendritic release of serotonin in the raphe nuclei of the rat: Effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralina. *J. Neurochem.*, 60: 1673-1681, 1993.
- ALAM, M.N.; GONG, H.; ALAM, T.; JAGANATH, R.; MCGINTY, D.; SZYMUZIAK, R. Sleep-waking discharge patterns of neurons recorded in the rat perifornical lateral hypothalamic area. *J. Physiol.*, 538:619-631, 2002.
- ANAND, B.; BROBECK, J.R. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J. Biol. Med.*, 24: 123-146, 1951.
- BAGDY, G. Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptor-mediated oxytocin, prolactin and ACTH/corticosterone responses. *Behavioural Brain Research*, 73:277-280, 1996.
- BELLIN, S.I.; RITTER, S. Disparate effects of infused nutrients on delayed glucoprivic feeding and hypothalamic norepinephrine turnover. *J. Neurosci.*, 1: 1347-1351, 1981.
- BENDOTTI, C.; SAMANIN, R. 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicits eating in free-feeding rats by acting on central serotonin neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 121: 147-150, 1986.
- BENDOTTI, C.; SAMANIN, R. The role of putative 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the control of feeding in rats. *Life Sciences*, 41:635-642, 1987.
- BERNARDIS, L.L. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Res.* 12: 321-381, 1987.
- BERT, B.; FINK, H.; HÖRTNAGL, H.; VEH, R.W.; DAVIES, B.; THEURING, F.; KUSSEROW, H. Mice over-expressing the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in cortex and dentate gyrus display exaggerated

- locomotor and hypothermic response to 8-OH-DPAT. *Behav. Brain Res.*, 167: 328-341, 2006.
- BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G.; GUARDIOLA, B.L.; BRUSH, M.M.; LEE, J.; BLANCHARD, D.C. An ethopharmacological analysis selective activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptor: The mouse 5-HT<sub>1A</sub> syndrome. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 57(4): 897-908, 1997.
- BLUNDELL, J.E. Is there a role for 5-hydroxytryptamine in feeding? *Int. J. Obesity* 1: 15-42, 1977.
- BLUNDELL, J.E. Serotonin and appetite. *Neuropharmacol.*, 23: 1537-1551, 1984.
- BLUNDELL, J. E. Serotonin manipulations and the structure of feeding behavior. *Appetite*, 7 (Suppl):39-56, 1986.
- BOVETTO S.; RICHARD, D. Functional assessment of 5-HT<sub>1A,1B,2A,2C</sub> and 3-receptor subtypes on food intake and metabolic rate in rats. *Am. J. Physiol. Soc.*, 363: R14 - R20, 1995.
- BREWERTON, T.D. Toward a unified theory of serotonin dysregulation in eating and related disorders. *Psychoneuroendocrinol*, 20: 561-590, 1995.
- CAREY, R.J.; DePALMA, G.; DAMIANOPOULOS, E. Cocaine and serotonin: a role for the 5-HT<sub>1A</sub> receptor site in the mediation of cocaine stimulant effects. *Behav. Brain Res.*, 126: 127-133, 2001.
- CAREY, R.J.; DePALMA, G.; DAMIANOPOULOS, E. 5-HT<sub>1A</sub> agonist/antagonist modification of cocaine stimulant effects: implications for cocaine mechanisms. *Behav. Brain Res.*, 132: 37-46, 2002a.
- CAREY, R.J.; DePALMA, G.; DAMIANOPOULOS, E. 8-OHDPAT effects upon cocaine unconditioned and conditioned behaviors:



A role for drug stimulus effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 72: 171-178, 2002b.

CAREY, R.J.; DePALMA, G.; DAMIANOPOULOS, E.; HOPKINS, A.; SHANAHAN, A.; MÜLLER, C.P.; HUSTON, J.P. Dopaminergic and serotonergic autoreceptor stimulation effects are equivalent and additive in the suppression of spontaneous and cocaine induced locomotor activity. *Brain Res.*, 1019: 134-143, 2004.

CASANOVAS, J.M.; LESOURD, M.; ARTIGAS, F. The effect of the selective 5-HT<sub>1A</sub> agonists alnespirone (S-20499) and 8-OH-DPAT on extracellular 5-hydroxytryptamine in different regions of rat brain. *Br. J. Pharmacol.*, 122: 733-741, 1997.

CHRONWALL, B.M. Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides*, 2: 6-11, 1985.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – COBEA. Os princípios éticos da experimentação animal. São Paulo, 1991.

COLLIN, M.; BACKBERG, M.; ONNESTAM, K.; MEISTER, B. 5-HT<sub>1A</sub> immunoreactivity in hypothalamic neurons involved in body weight control. *Neuroreport*, 13:945-951, 2002.

COSCINA, D.V.; FEIFEL, D.; NOBREGA, J.N.; CURRIE, P.J. Intraventricular but not intraparenchymal nucleus accumbens metergoline elicits feeding in satiated rats. *Am. Physiol. Soc.*, R1562-R1567, 1994.

COSCINA, D.V.; CURRIE, P.J.; BISHOP, C.; PARKER, G.C.; ROLLINS, B.L.; KING, B.M. Posterodorsal amygdala lesions reduce feeding stimulated by 8-OH-DPAT. *Brain Res.*, 883: 243-249, 2000.

CURRIE, P.J.; COSCINA, D.V. Diurnal variations in the feeding response to 8-OH-DPAT injected into the dorsal or median raphe. *Neuroreport*, 4: 1105-1107, 1993.

- CURRIE P.J.; COSCINA, D.V. Effects of metergolin on feeding, 5-HT anorexia and 5-HT inhibition of NE-induced eating. *Int. J. Obes.* 18: 71, 1994a.
- CURRIE P.J., FLETCHER P.J., COSCINA D.V. Administration of 8-OH-DPAT into the midbrain raphe nuclei: effects on medial hypothalamic NE-induced feeding. *Am. J. Physiol.*, 266: R1645-R1651, 1994b.
- CURRIE P.J.; COSCINA, D.V. Metergoline potentiates natural feeding and antagonizes the anorectic action of medial hypothalamic 5-hydroxytryptamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 53(4): 1023-1028, 1996.
- CURZON, G. Serotonin and appetite. *Ann. NY Acad. Sci.* 600: 521-531, 1990.
- DE BOER, S.F.; KOOLHAAS, J.M. 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors agonists and aggression: A pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *Eur. J. Pharmacol.*, 526: 125-139, 2005.
- DECAVEL, J.N.; VAN DEN POL, B. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.*, 302: 1019-1037, 1990.
- DE VRY, J. 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacol.*, 121: 1-26, 1995.
- DE VRY, J., SCHREIBER, R., DASCHKE, A., JENTZSCH, K. R. Effects of serotonin 5-HT<sub>1/2</sub> agonists in a limited-access operant food intake paradigm in the rat. *European Neuropsychopharmacology*, 1:1-9, 2003.
- DOURISH, C.T.; HUTSON, P.H.; CURZON, G. Characteristics of feeding induced by the serotonin agonist 8-hydroxy-2-(Di-n-Propylamino) tetralin (8-OH-DPAT). *Brain Res. Bull.*, 15: 377-384, 1985a.

- DOURISH, C.T.; HUTSON, P.H.; CURZON, G. Low doses of the putative serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicit feeding in the rat. *Psychopharmacol.*, 86: 197-204, 1985b.
- DOURISH, C.T.; HUTSON, P.H.; CURZON, G. Para-chlorophenylalanine prevents feeding induced by the serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralina (8-OH-DPAT). *Psychopharmacol.*, 89: 467-471, 1986a.
- DOURISH, C.T.; HUTSON, P.H.; KENNETT, G.A.; CURZON, G. 8-OH-DPAT induced hyperphagia: its neural basis and possible therapeutic relevance. *Appetite Suppl.*, 7: 127-140, 1986b.
- DOURISH, C.T.; COOPER, S.J.; GILBERT, F.; COUGHLAN, J.; IVERSEN, S.D. The 5-HT<sub>1A</sub> agonist 8-OH-DPAT increased consumption of palatable wet mash and liquid diets in the rat. *Psychopharmacol.*, 94: 58-63, 1988.
- DOURISH, C.T.; CLARK, M.L.; FLETCHER, A.; IVERSEN, S.D. Evidence that blockade of postsynaptic 5-HT<sub>1</sub> receptors elicits feeding in satiated rats. *Psychopharmacol.*, 97: 54-58, 1989.
- DOURISH, C.T. 5-HT receptor subtypes and feeding behavior. In: BRODLEY, P.B.; HANDLEY, S.L.; COOPER, S.J.; BARNES, N.M.; COOTE, J.M. (Eds). Serotonin receptor and brain functions, *Pergamon*, New York, p. 179-202, 1992.
- DRYDEN, S.; FRANKISH, H.M.; WANG, Q.; WILLIAMS, G. Increased feeding and neuropeptide Y (NPY) but not NPY mRNA levels in the hypothalamus of the rat following central administration of the serotonin synthesis inhibitor p-chlorophenylalanine. *Brain Research*, 724:232-237, 1996.
- DUBE, M.G.; KALRA, S.P.; KALRA, P.S. Food intake elicited by central administration of orexins: identification of hypothalamic sites of action. *Program of the 28<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, Los Angeles, CA, vol 24: 448, 1998.

- EBENEZER, I.S. Effects of the 5-HT<sub>1A</sub> agonist, 8-OH-DPAT, on operante food intake in non-deprived rats. *Neuroreport*, 3: 62-64, 1992a.
- EBENEZER, I.S. Effects of the 5-HT<sub>1A</sub> agonist, 8-OH-DPAT, on food intake in food-deprived rats. *Neuroreport*, 3: 1019-1022, 1992b.
- EBENEZER, I.S.; PARROTT, R.F.; VELLUCCI, S.V. Effects of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT on operant food intake in food-deprived pigs. *Physiol. Behav.*, 67: 213-217, 1999.
- FERGUSON, J.; HENRIKSON, S.; COHEN, H.; HOYT, G.; MITCHELL, G.; McGARR, K.; RUBENSON, D.; RAYAN, L. AND DEMENT, W. The effect of chronic administration of p-chlorophenylalanine on the behavior of cats. *Psychophysiol.* 6: 220-221, 1969.
- FERNSTROM, J.D. AND WURTMAN, R.J. Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science*, 178: 414-416, 1972.
- FLETCHER, P.J. Increased food intake in satiated rats induced by the 5-HT antagonists methysergide, metergoline and ritanserin. *Psychopharmacol.*, 96: 237-242, 1988.
- FLETCHER, P.J.; DAVIES, M. Dorsal raphe microinjection of 5-HT and indirect 5-HT agonists induces feeding in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 184: 265-271, 1990a.
- FLETCHER, P.J.; DAVIES, M. A pharmacological analysis of the eating response induced by 8-OH-DPAT injected into the dorsal raphe nucleus reveals the involvement of a dopaminergic mechanisms. *Psychopharmacol.*, 100: 188-194, 1990b.
- FLETCHER, P.J. Dopamine receptor blockade in nucleus accumbens or caudate nucleus differentially affects feeding

- induced by 8-OH-DPAT injected into dorsal or median raphe. *Brain Res.*, 552: 181-189, 1991a.
- FLETCHER, P.J. Opiate antagonists inhibit feeding induced by 8-OH-DPAT: possible mediation in the nucleus accumbens. *Brain Res.*, 560: 260-267, 1991b.
- FLETCHER, P.J.; COSCINA, D.V. Injecting 5-HT into the PVN does not prevent feeding induced by injecting 8-OH-DPAT into the raphe. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 46: 487-491, 1993.
- FOSTER, D.W.; McGARR, J.D. Glucose, lipid and protein metabolism. In: GRIFFIN, J.J.E.; OJEDA, S.R. (Eds). *Textbook of endocrine physiology*. USA, p.349-374, 1996.
- FUENMAYOR, L.D.; GARCIA, S. The effect of fasting on 5-hydroxytryptamine metabolism in brain regions of the albino rat. *Br. J. Pharmacol.*, 83: 357-362, 1984.
- FUNAHASHI, H.; YAMADA, S.; KAGEYAMA, H.; TAKENOYA, F.; GUAN, J.L.; SHIODA, S. Co-existence of leptin- and orexin-receptors in feeding-regulating neurons in the hypothalamic arcuate nucleus: a triple labeling study. *Peptides* 24: 687-694, 2003.
- GERASHCHENKO, D.; KOHIS, M.D.; GRECO, M.; WALEH, N.S.; SALIN-PASCUAL, R.; KILDUFF, T.S.; LAPPI, D.A.; SHIROMANI, P.J. Hypocretin-2-saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat. *J. Neurosci.*, 21:7273-7283, 2001.
- GILBERT, F.; DOURISH, C.T. Effects of the novel anxiolytics gepirone, buspirone and ipsapirone on free feeding and on feeding induced by 8-OH-DPAT. *Psychopharmacol.*, 93: 349-352, 1987.
- GLENNON, R.A.; DUKAT, M. Serotonin receptor subtypes. In: BLOOM, F.E. and KUPFER, D.J. (Eds.) *"Psychopharmacology:*

*the fourth generation of progress*", New York: Raven Press, p. 415-429, 1995.

- GOOLEY, J.; SCHOMER, A.; SAPER, C.B. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food entrainable circadian rhythms. *Nature Neurosci.*, 9(3): 398-407, 2006.
- GOODALL, E.; SILVERSTONE, T. Differential effect of d-fenfluramine and metergoline on food intake in human subjects. *Appetite*, 11: 215-228, 1988.
- GUNDLACH, A.L.; BURAZIN, T.C.; LARM, J.A. Distribution, regulation and role of hypothalamic galanin systems: renewed interest in a pleiotropic peptide family. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 28(1/2): 100-5, 2001.
- GUNDLAH, C.; PECINS-THOMPSON, M.; SCHUTZER, W.E.; BETHEA, C.L. Ovarian steroid effects on serotonin 1A, 2A and 2C receptor mRNA in macaque hypothalamus. *Mol. Brain Res.*, 63: 325-339, 1999.
- HAHN, T.M.; BREININGER, J.F.; BASKIN, D.G.; SCHWARTZ, M.W. Coexpression of AGRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat. Neurosci.*, 1(4): 271-2, 1998.
- HESLOP, K.E.; CURZON, G. Effect of reserpine on behavioural responses to agonists at 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, and 5-HT<sub>2C</sub> receptor subtypes. *Neuropharmacology*, 38: 883-91, 1999.
- HETHERINGTON, A.; RANSON, S. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat. Rec.*, 78: 149-172, 1940.
- HJORTH, S.; SHARP, T. Effect of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis. *Life Sci.*, 48: 1779-1786, 1991.

- HUTSON, P.H.; DOURISH, C.T.; CURZON, G. Neurochemical and behavioural evidence for mediation of the hyperphagic action of 8-OH-DPAT by 5-HT cell body autoreceptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 129: 347-352, 1986a.
- HUTSON, P.H.; SARNA, G.S.; SAHAKIAN, B.J.; DOURISH, C.T.; CURZON, G. Monitoring 5-HT metabolism in the brain of the freely moving rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 473: 321-336, 1986b.
- HUTSON P.H.; DONOHOE T.P. ; CURZON, G. Infusion of the 5-hydroxytryptamine agonists RU24969 and TFMPP into the paraventricular nucleus of the hypothalamus causes hypophagia. *Psychopharmacol.*, 195: 550-552, 1988a.
- HUTSON P.H.; DOURISH, C.T.; CURZON, G. Evidence that hyperphagic response to 8-OH-DPAT is mediated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Europ. J. Pharmacol.* 150: 361-367, 1988b.
- JHAWAR-UNIYAL, M.; BECK, B.; JHANWAR, Y.S.; BURLET, C.; LEIBOWITZ, S.F. Neuropeptide Y projection from arcuate nucleus to parvocellular division of the paraventricular nucleus: specific relation to the ingestion of carbohydrate. *Brain Res.*, 631: 97-101, 1993.
- JOYCE, D.; MROSOVSKY, N. Eating, drinking and activity in rats following 5-hydroxytryptophan (5-HTP) administration. *Psychopharmacol.* 5: 417-423, 1964.
- KALRA, S.P.; DUBE, M.G.; PU, S.; XU, B.; TAMAS, L.H. Interacting appetite-regulating pathways the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Reviews.*, 20: 68-100, 1999.
- KANTAK, K.M.; WAYNER, M.J.; STEIN, J.M. Effects of various periods of food deprivation on serotonin synthesis in the lateral hypothalamus. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 9: 535-541, 1978.
- KAWANO, H.; HONMA, S.; HONMA, A.; HORIE, M.; KAWANO, Y.; HAYASHI, S. Melanin-concentrating hormone neuron system:

the Wide Web that controls the feeding. *Anat Sci Int.*, 77(3): 149-60, 2002.

- KELLY, J.; ALHEID, G.F.; NEWBERG, L.; GROSSMAN, S.P. Gaba stimulation and blockade in the hypothalamus and midbrain: effects on feeding and locomotor activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 7: 537-541, 1977.
- KELLY, J.; GROSSMAN, S.P. GABA and hypothalamic feeding systems. *Brain Res Bull.*, 5: 237-244, 1980.
- KITAMURA, Y.; NAGATANI, T. Buspirone enhances immobility in the forced swim test in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 55(3): 445-451, 1996.
- KOYLU, E.O.; COUCEYRO, P.R.; LAMBERT, P.D.; LING, N.C.; DeSOUZA, E.B.; KUHAR, M.J. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J. Neuroendocrinol*, 9(11): 823-33, 1997.
- KRAHN, D.D.; GOSNELL, B.; LEVINE, A.S.; MORLEY, J.E. Localization of the effects of corticotropin releasing factor on feeding. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 10: 302-308, 1984.
- KREISS, L. AND LUCKI, IRWIN. Chronic Administrations of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT differentially desensitizes 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors of the dorsal and median raphe nuclei. *Synapse*, 25: 107-116, 1997.
- KYRKOULI, S.E.; STANLEY, B.G.; SEIFARI, R.D.; LEIBOWITZ, S.F. Stimulation of feeding by galanin: anatomical localization and behavioral specificity of this peptide's effects in the brain. *Peptides*, 11: 995-1001, 1990.
- LARM, J.A.; GUNDLACH, A.L. Galanin-like peptide (GALP) mRNA expression is restricted to arcuate nucleus of hypothalamus in adult male rat brain. *Neuroendocrinology*, 72(2): 67-71, 2000.



- LEIBOWITZ, S.F. Paraventricular nucleus: a primary site mediating adrenergic stimulation of feeding and drinking. *Pharmacol Biochem Behav.*, 8: 163-175, 1978.
- LEIBOWITZ, S.F.; HAMMER, N.J.; CHANG, K.; Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produced overeating and obesity in the rat. *Physiol. Behav.*, 27: 1031-1040, 1981.
- LEIBOWITZ, S.F.; WEISS, G.; SHOR-POSNER, G. Hypothalamic serotonin: Pharmacological, biochemical and behavioral analyses of its feeding suppressive, 1988.
- LEIBOWITZ, S.F. The role of serotonin in eating disorders. *Drugs*, 39: 33-48, 1990a.
- LEIBOWITZ, S.F.; WEISS, G.F. AND SUH, J.S. Medial hypothalamic nuclei mediate serotonin inhibitory effect on feeding behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37: 735-742, 1990b.
- LEIBOWITZ, S.F.; SHOR-POSNER, G.; WEISS, G.F. Serotonin in medial hypothalamic nuclei controls circadian pattern of macronutrient intake. In: *Serotonin: From Cell Biology to Pharmacology and Therapeutics*. Kluwer Acad. Publisher, p. 203-211, 1990c.
- LEIBOWITZ, S.F.; ALEXANDER, J.T.; CHEUNG, W.K.; WEISS, G.F. Effects of serotonin and the serotonin blocker metergoline on meal patterns and macronutrient selection. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 45: 185-194, 1993.
- LEIBOWITZ, S.F. Specificity of hypothalamic peptides in the control of behavioral and physiological processes. In: STRAND, F.L.; BECKWITH, B.E.; CHRONWALL, B.; SANDMAN, C.A. (Eds). *Models of neuropeptide action*. New York: Academy of Sciences, Vol. 739, p. 12-35, 1994.
- LEWIS, K.; LI, C.; PERRIN, M.H.; BLOUNT, A.; KUNITAKE, K.; DONALDSON, C. et al. Identification of urocortin III, an

- additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(13): 7570-5, 2001.
- LI, Q.; BATTAGLIA, G.; VAN DE KAR, L.D. Autoradiographic evidence for differential G-protein coupling of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in rat brain: lack of effect of repeated injections of fluoxetine. *Brain Res.*, 769: 141-151, 1997.
- LOULLIS, C.C.; FELTEN, D.L.; SHEA, P.A. HPLC determination of biogenic amines in discrete brain areas in food deprived rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 11: 89-93, 1979.
- LUTZ, L.A.; DEL PRETE, E.; SCHARRER, E. Subdiaphragmatic vagotomy does not influence the anorectic effect of amylin. *Peptides*, 16: 457-462, 1995.
- MARTIN, L.P.; JACKSON, D.M.; WALLSTEN, C.; WASZCZAK, B.L. Electrophysiological comparison of 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists on dorsal raphe cell firing. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288: 820-826, 1999.
- MATSUZAKI, I.; SAKURAI, T.; KUNII, K.; NAKAMURA, T.; YANAGISAWA, M.; GOTO, K. Involvement of the serotonergic system in orexin-induced behavioral alterations in rats. *Regul. Peptides*, 104: 119-123, 2002.
- McGOWAN, M.K.; ANDREWS, K.M.; GROSSMAN, S.P. Chronic intrahypothalamic infusions of insulin or insulin antibodies alter body weight and food intake in the rat. *Physiol. Behav.*, 51: 753-766, 1992.
- MERCHENTHALER, I.; LOPEZ, F.J.; NEGRO-VILAR, A. Anatomy and physiology of central galanin- containing pathway. *Prog. Neurobiol.*, 40: 711-769, 1993.
- MONTGOMERY, A.M.J.; GROTTICK, A.J. Neurotransmitter system interactions revealed by drug-induced changes in

- motivated behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 62: 643-657, 1999.
- MORA, F.; ROLLS, E.T.; BURTON, M.J. Modulation during learning of the responses of neurons in the lateral hypothalamus to the sight of food. *Exp. Neurol.*, 53: 508-519, 1976.
- NAGAI, K.; NISHIO, T.; NAKAGAWA, H.; NAKAMURA, S.; FUKUDA, Y. Effect of bilateral lesions of the suprachiasmatic nucleus on the circadian rhythm of food intake. *Brain Res.*, 142: 384-389, 1978.
- NAKAMURA, K.; ONO, T.; TAMURA, R.; INDO, M.; TAKASHIMA, Y.; KAWASAKI, M. Characteristics of lateral hypothalamic neuron responses to smell and taste in emotional behavior. *Brain Res.*, 491: 15-32, 1989.
- NAMBU, T.; SAKURAI, T.; MIZUKAMI, K.; HOSOYA, Y.; YANAGISAWA, M.; GOTO, K. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res.*, 827(1/2): 243-60, 1999.
- NICOLAIDIS, S.; ROWLAND, N.E. Metering of intravenous versus oral nutrients and regulation of energy balance. *Am. J. Physiol.*, 231: 661-668, 1976.
- OLIGIATI, V.R.; NETTI, C.; GUIDOBONO, F.; PECILE, B. The central GABAergic system and control of food intake under different experimental conditions. *Psychopharmacology*, 68: 163-167, 1980.
- ONO, T.; SASAKI, K.; NISHINO, H.; FUKUDA, M.; SHIBATA, R. Feeding and diurnal related activity of lateral hypothalamic neurons in freely behaving rats. *Brain Res.*, 373: 92-102, 1986.
- OOMURA, Y.; NISHINO, H.; KARADI, Z.; AOU, S.; SCOTT, T.R. Taste and olfactory modulation of feeding related neurons in behaving monkey. *Physiol. Behav.*, 49: 943-950, 1991.

- PALKOVITS, M. Interconnections between the Neuroendocrine Hypothalamus and the Central Autonomic System. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 20: 270-295, 1999.
- PARKER, G.C.; COSCINA, C.V. Lesions of the posterior basolateral amygdala block feeding induced by system 8-OH-DPAT, *Pharmacol. Biochem. Behav*, 68(4) 729-734, 2001a.
- PARKER, G.C.; BALBOOL, R.; HOBDAV, J.A.; COSCINA, D.V. 5-HT receptor blockade in the posterior amygdala elicits feeding in female rats. *Neuroreport*, 12(5): 411-414, 2001b.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 3<sup>o</sup> ed. Harcourt Brace Jovanovich, 1998.
- POESCHLA, B.; GIBBS, J.; SIMANSKY, K.J.; SMITH, G.P. The 5-HT<sub>1A</sub> agonist 8-OH-DPAT attenuates the satiating action of cholecystokinin. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 42: 541-543, 1992.
- POMPEIANO, M.; PALACIOS, J.M.; MENGOD, G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the rat brain: Correlation with receptor binding. *J. Neurosci.*, 12: 440-453, 1992.
- REDDY, V.M.; MEHARG, S.S.; RITTER, S. Dose-related stimulation of feeding by systemic injection of monosodium glutamate. *Physiol. Behav.*, 38: 465-469, 1986.
- RICHARD, D.; HUANG, Q.; TIMOFEEVA, E. The corticotropin-releasing hormone system in the regulation of energy balance in obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 24(Suppl 2):S36-9, 2000.
- RITTER, S.; STONE, S.L. Area postrema lesions block feeding induced by systemic injections of monosodium glutamate. *Physiol. Behav.*, 41: 21-24, 1987.
- RITTER, S.; DINH, T.T.; FRIEDMAN, M.I. Induction of Fos-like immunoreactivity (Fos-li) and stimulation of feeding by 2,5-

- anhydro-d-mannitol (2,5-AM) require the vagus nerve. *Brain Res.*, 646: 53-64, 1994.
- ROLLS, E.T.; BURTON, M.J.; MORA, F. Neurophysiology analysis of brain-stimulation reward in the monkey. *Brain Res.*, 194: 339-357, 1980.
- ROSELLI-REHFUSS, L.; MOUNTJOY, K.G.; ROBBINS, L.S.; MORTRUD, M.T.; LOW, M.J.; TATRO, J.B. Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(19): 8856-60, 1993.
- ROSSI, M.; CHOI, S.J.; O'SHEA, D.; MIYOSHI, T.; GHATEI, M.; BLOOM, S.R. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology*, 138: 351-355, 1997.
- ROWLAND, N.E.; BELLUSH, L.L.; CARLTON, J. Metabolic and neuro chemical correlates of glucoprivic feeding. *Brain Res. Bull.*, 14: 617-622, 1985.
- ROWLAND, N.E. Biological factors in eating and its disorders. *Bull. Psychonomic. Soc.*, 29: 244-248, 1991.
- ROWLAND, N.E.; MORIEN, A.; LI, B.H. The physiology and brain mechanisms of feeding. *Nutrition*, 12: 626-639, 1996.
- SAKURAI, T.; AMEMIYA, A.; ISHII, M.; MATSUZAKI, I.; CHEMELLI, R.M.; TANAKA, H.; WILLIAMS, S.C.; RICHARDSON, J.; KOZLOWSKI, G.P.; WILSON, S.; ARCH, J.R.; BUCKINGHAM, R.E.; HAYNES, C.; CARR, S.; ANNAN, R.S.; MCNULTY, D.E.; LIU, W.S.; TERRET, J.; ELSHOUBAGY, N.; BERGSMA, D.J.; YANAGISAWA, M. Orexins and orexina receptor: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92: 573-585, 1998.
- SAMANIN, R.; MENNINI, T.; BENDOTTI, C.; BARONE, D.; CACCIA, S.; GARATTINI, S. Evidence that central 5-HT<sub>2</sub> receptors do

not play an important role in the anorectic activity of d-fenfluramine in the rat. *Neuropharmacol.*, 28:465-469, 1989.

SAMANIN, R.; GRIGNASCHI, G. Role of 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes in satiety and animal models of eating disorders. In: COOPER, S.J. AND CLIFTON, P.G. (Eds.), *Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behaviour*, London: Academic Press, p. 39-58, 1996.

SAPER, C.B.; CHOU, T.C.; SCAMMELL, T.E. The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci.*, 24:726-731, 2001.

SATOH, N.; OGAWA, Y.; KATSUURA, G.; TSUIJI, T.; MASUZAKI, H.; HIROAKA, J.; KASAKI, T.; TAMOKI, M.; HYASHI, M.; YOSHIMASA, Y.; NISHI, S.; NOSODA, K.; NAKAO, K. Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats. *Endocrinology.*, 138: 947-954, 1997.

SCLAFANI, A.; BERNER, C.N. Hyperphagia and obesity procuced by parasagital and coronal hypothalamic knife cuts: further evidence for a longitudinal feeding inhibitory pathway. *J. Comp. Physiol.*, 9: 1000-1018, 1977.

SIMANSKY, K.J. 5-HT receptor subtypes influencing feeding and drinking: Focus on the periphery. In: DOURISH, C.; COOPER, S.J. (Eds). *Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behaviour*. New York: Academic Press, p. 59-76, 1996.

SMITH, G.P.; GIBBS, J. Postprandial satiety. In: SPRANGUE, J.M.; EPSTEIN, A.N. (Eds). *Progress Psychobiology Psysiological Physiological*. New York: Academic Press, p. 179-242, 1979.

STALLONE, D.; NICOLAIDIS, S. Increased food intake and carbohydrate preference in the rat following treatment with the

- serotonin antagonist metergoline. *Neurosci. Lett.* 102: 319-324, 1989a.
- STALLONE, D.; NICOLAIDIS, S.; GIBBS, J. Cholecystokinin-induced anorexia depends on serotonergic function. *Am. J. Physiol.* 256: 1138-1141, 1989b.
- STELLAR, E. The physiology of motivation. *Psychol. Rev.*, 61:5, 1954.
- STRUBBE, J.H.; DIJK, G.V. The temporal organization of ingestive behavior and its interaction with regulation of energy balance. *Neurosci. Biobehav. Res.*, 26: 485-498, 2002.
- STUCKEY, J.A.; GIBBS, J.; SMITH, G.P. Neural disconnection of gut from brain blocks bombesina-induced satiety. *Peptides*, 6: 1249-1255, 1995.
- SUGIMOTO, Y.; YAMADA, J.; YOSHIKAWA, T. A neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole reduces the 5-HT<sub>1A</sub> receptor against 8-OH-DPAT-elicited hyperphagia in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 376: 1-5, 1999.
- TAKENOYA, F.; KAGEYAMA, H.; GUAN, J.; FUNAHASHI, H.; KATOH, S.; MATSUMOTO, H. Galanin-like peptide (GALP)-containing neuron network in the hypothalamus. *SFN 33<sup>rd</sup> Annual Meeting*, New Orleans, Louisiana, November 8-12, Session 508.6., 2003.
- TELLES, M.M.; GUIMARÃES, R.B.; RIBEIRO, E.B. Effect of leptin on the arcuate feeding-induced hypothalamic serotonergic stimulation in normal rats. *Regulatory Peptides*, 115: 11-18, 2003.
- VAN DEN POL, B.N.; WUARIN, J.P.; DUDEK, F.E. Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Science*, 250: 1276-1278, 1990.
- VERTES, R.P.; MARTIN, G.F. Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic

- reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 275: 511-541, 1988.
- VOIGT, J.P.; FINK, H.; MARSDEN, C.A. Evidence for the involvement of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in CCK induced satiety in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 351: 217-220, 1995.
- VOIGT, J.P.; KIENZLE, F.; SOHR, R.; REX, A.; FINK, H. Feeding and 8-OH-DPAT-related release of serotonin in the rat lateral hypothalamus. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 65(1): 183-189, 2000.
- WATTS, A.G. Understanding the neural control of ingestive behaviors: helping to separate cause from effect with dehydration-associated anorexia. *Hormones and Behavior*, 37: 261-283, 2000.
- WEISS, G.F.; PAPADAKOS, P.; KNUDSON, K.; LEIBOWITZ, S.F. Medial hypothalamic serotonin: effects on deprivation and norepinephrine-induced eating. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 25: 1223-1230, 1986.
- WELTZIN, T.E.; FERNSTROM, M.H.; KAYE, W.H. Serotonin and bulimia nervosa. *Nutr. Rev.*, 52: 399-408, 1994.
- WILLIAMS, G.; BING, C.; CAI, X.J.; HARROLD, J.A.; KING, P.J.; LIU, X.H. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol. Behav.*, 74: 683-701, 2001.
- WOODS, S.C.; STRICKER, E.M. Food intake and metabolism. In: *Fundamental neuroscience.*, New York: Academic Press, p.1091-1109, 1999.
- WRIGHT, D.E.; SEROOGY, K.B.; LUNDGREN, K.H.; DAVIS, B.M.; JENNES, L. Comparative localization of serotonin 1A, 1C and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 351: 357-373, 1995.



XU, B.; KALRA, P.S.; KALRA, S.P. Food restriction abolishes the daily rhythm in gene expression of hypothalamic neuropeptide Y (NPY), galanin (GAL) and  $\beta$ -endorphin (POMC) and adipocyte leptin but not in leptin secretions. *Program of the 80<sup>th</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society*, New Orleans, P3-246, 1998.